# Zur Analytik der Bioflavonoide in Citrusfrüchten

Hans Schmid

1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0048

# Zur Analytik der Bioflavonoide in Citrusfrüchten

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Hans Schmid

aus

Leutkirch/Allgäu

November 1961

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r

Tag der mündlichen Prüfung: 28. FEB. 1962

# INHALTSÜBERSICHT


Seite

A. EINLEITUNG . . . . . 1

B. PHARMAKOLOGIE . . . . . 3

C. ZUR ANALYTIK DER BIOFLAVONOIDE . . . . . 7

I. Farbreaktionen und Papierchromatographie der Bioflavonoide aus Citrusfrüchten . . . . . 8

II. UV-spektrophotometrische Untersuchungen . . . . . 13
a) Spektren in äthanolischer Lösung . . . . . 13
b) UV-Spektren nach Zusatz von Komplexbildern und Natriumazetat . . . . . 14
c) UV-Spektren nach Alkalizusatz . . . . . 16

III. Bisherige Methode zur quantitativen Bestimmung von Flavanonen in Citrusfrüchten . . . . . 19

IV. Darstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Citrusbioflavonoide . . . . . 20

V. Ermittlung von geeigneten Versuchsbedingungen für eine spektrophotometrische Bestimmung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Flavanone . . . . . 24

VI. Aufstellung von 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Flavanon Eichkurven mit dem Zeiss-Opton-Spektrophotometer m 4 Q 26

VII. Aufstellung von Eichkurven mit dem Universalkolorimeter J nach LANGE . . . . . 31

VIII. Quantitative Bestimmung von Flavanonen in Citrusfrüchten . . . . . 33
a) Ausarbeitung einer Bestimmungsmethode für Naringin im Saft von Citrus decumana L. . . . . 34
b) Bestimmungsmethode für Hesperidin im Saft Citrus aurantium sin. L. . . . . 36
c) Bestimmung von Hesperidin und Eriodictin im Saft von Citrus medica L. . . . . 38

IX. Anwendung der Flavanonbestimmung auf Handelsprodukte 40
a) Bestimmung von Naringin im Saft der "Texas" Grapefruit . . . . . 40

Seite

b) Bestimmung von Naringin im Saft von "Sunkist" Grapefruit . . . . . 41
c) Bestimmung des Naringingehaltes von "Plymouth Grapefruit Juice" . . . . . 41
d) Bestimmung von Hesperidin im Saft von "Navel" Orangen . . . . . 42
e) Bestimmung von Hesperidin in der Orangeade "Libella" . . . . . 43
f) Bestimmung von Hesperidin und Eriodictin im "Sunkist Lemon Bioflavonoid Komplex Nr. 497" . . 44
g) Bestimmung des Hesperidin-Eriodictin-Gemisches in "Sunkist Lemon Juice" . . . . . 45
h) Bestimmung von Hesperidin im "Hohen C" (Orangensaft) . . . . . 45
i) Übersicht über den Bioflavonoidgehalt der von uns untersuchten Handelsprodukte . . . . . 47

X. Vergleich unserer Methode mit der nach DAVIS . . . . 48

D. E X P E R I M E N T E L L E R T E I L . . . . . 50
I. Isolierung der Citrusbioflavonoide . . . . . 50
a) Isolierung von Hesperidin (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon-7-rhamnoglucosid) . . . . . 50
b) Isolierung von Naringin (5,4'-Dihydroxyflavanon-7-rhamnoglucosid) . . . . . 51
c) I-solierung von Eriodictyol (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon) . . . . . 52
d) Isolierung von Homoeriodictyol (5,7,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavanon) . . . . . 53

II. Hydrolyse und Methylierung . . . . . 54
a) Hydrolyse von Hesperidin . . . . . 54
b) Hydrolyse von Naringin . . . . . 54
c) Methylierung von Hesperetin . . . . . 55

III. Darstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Hesperidin, Hesperetin, Naringin, Naringenin und Homoeriodictyol . . . . . 56

IV. Aufstellung von 2,4-DNPH-Flavanon-Eichkurven mit dem Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q . . . . . 57

Seite

V. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Naringin im Saft der Grapefruit . . . . . 58

VI. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hesperidin im Saft der Orange . . . . . 59

VII. Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines Hesperidin-Eriodictin-Gemisches (als Hesperidin berechnet) im Saft einer Zitrone . . . . . 61

VIII. Anwendung der Flavanonbestimmung auf Handelsprodukte 62

E. A N H A N G . . . . . 65

I. Geschichte und Vorkommen von Hesperidin, Naringin, Homoeriodictyol und Eriodictin . . . . . 65

a) Hesperidin . . . . . 65

b) Homoeriodictyol . . . . . 65

c) Naringin . . . . . 66

d) Eriodictin . . . . . 66

II. Infrarotspektren der Citrusbioflavonoide . . . . . 67

a) Frequenz der Carbonylbande . . . . . 67

b) Frequenz der Intensität der OH-Banden . . . . . 70

c) Der Einfluß verschiedener Substitution im Seitenphenyl . . . . . 71

## A. E I N L E I T U N G

Schon bald nach der Einführung von chemisch reinem Vitamin C (l-Ascorbinsäure) in die Therapie, wurde von SZENT-GYÖRGYI und Mitarbeitern[1] die Beobachtung gemacht, daß Extrakte aus Paprika und Zitronensaft bei hämorrhagischer Diathese eine weit bessere Wirkung entfalten, als die reine kristallisierte Ascorbinsäure. Die Überlegenheit dieser Naturprodukte deuteten die genannten Forscher dahingehend, daß der Ascorbinsäure allein nur eine bedingte blutungsverhindernde Wirkung zukomme und für den günstigen Heileffekt noch ein weiterer Faktor verantwortlich zu machen sei. Bei der Aufarbeitung von Zitronen und Paprikaschoten gelang es, diesen Wirkstoff, das Citrin, anzureichern und in kristallisierter Form zu gewinnen. Diese Substanz nannte SZENT-GYÖRGYI Vitamin P (Permeabilitätsvitamin), da sie bei seinen Versuchen eine kapillar-abdichtende Wirkung zeigte. Da aber bis heute keine eigentliche Citrin-Mangelerscheinung bekannt geworden ist, wird die Bezeichnung Vitamin P nur noch selten verwendet. Statt dessen gebraucht man den Ausdruck B i o f l a v o n o i d e und trägt damit der flavonoiden Struktur und seiner biokatalytischen Wirksamkeit Rechnung.

Zu den Bioflavonoiden zählt man Hesperidin, Rutin, Eriodictin, Homoeriodictyol und Naringin.

Wenn auch die pharmakologische Wirkungsweise bisher noch nicht befriedigend geklärt ist, so zeigt doch die klinische Erfahrung, daß die Bioflavonoide bei zahlreichen Erkrankungen, die mit einer Schädigung der Kapillarwand einhergehen, günstige therapeutische Eigenschaften besitzen. Vor allem die günstige Beeinflussung von Strahlenschäden durch Bioflavonoide hat das Interesse an diesen Stoffen in der letzten Zeit stark erhöht.

Die pharmazeutische Industrie stellt eine große Anzahl von Präparaten her, die entweder die Bioflavonoide in reiner Form oder in Kombination mit anderen Stoffen enthalten. Daneben sind verschiedene Fruchtsäfte im Handel, deren Hauptbestandteil die Bioflavonoide sind.

---

1) A.SZENT-GYÖRGYI, Dtsch.med.Wschr. 62, 1325 (1936), Nature 138, 27, 798 (1936)

Infolge ihrer weitläufigen therapeutischen Anwendung ist es dringend notwendig geworden, die verschiedenen Handelsprodukte auf ihren Gehalt an Bioflavonoiden zu untersuchen bzw. quantitative Bestimmungsmethoden auszuarbeiten, die eine Standardisierung und einwandfreie analytische Begutachtung ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, zunächst eine kurze zusammenfassende Darstellung über die Pharmakologie und Analytik der Bioflavonoide zu geben und anschließend neue, exakte qualitative und quantitative Nachweismethoden auszuarbeiten, um die einzelnen Bioflavonoide in den verschiedenen Handelsprodukten quantitativ erfassen zu können.

## B. P H A R M A K O L O G I E

Das von SZENT-GYÖRGYI und Mitarbeitern[2] aus Zitronen isolierte Produkt C i t r i n stellt ein Gemisch von Hesperidin und Eriodictin dar.

1938 fand HUSZAK[3], daß Eriodictin die Oxydation der A s c o r b i n s ä u r e im pflanzlichen Gewebe stark beschleunigt, worauf SZENT-GYÖRGYI die Flavanone mit dem A t m u n g s s y s t e m der Pflanzen in Zusammenhang brachte.

Da Citrin auch den Gefäßtonus beeinflußt, vermutete LAVOLLAY[4], daß eine Beziehung zur A d r e n a l i n w i r k u n g besteht. Er stellte an isolierten Organen eine Oxydationsverzögerung des Adrenalins durch Citrin fest[5], die allerdings in vivo nicht reproduzierbar war. Daraufhin führte der Autor die Versuche mit anderen Verbindungen fort und fand im Katechin eine Substanz, die nicht nur die Widerstandsfähigkeit der Kapillaren beträchtlich erhöhte, sondern auch die Adrenalinwirkung in vivo verlängerte.

1943 führte HIGBY[6] pharmakologische Untersuchungen mit Hesperidin und Eriodictin durch. Er fand, daß r e i n e s Hesperidin und r e i n e s Eriodictin keinen Einfluß auf den Kapillarwiderstand haben. HIGBY führt dies auf die Unlöslichkeit des Hesperidins zurück und spricht die Vermutung aus, daß Hesperidin in löslicher Form wirksam sein könnte. Die Suche nach einer entsprechenden wasserlöslichen Verbindung mit Vitamin P-Wirksamkeit führte zur Isolierung eines gelben Pigments, das sich mit einem künstlich hergestellten Hesperidinchalkon als identisch erwies.

Im Jahre 1942 berichteten dann WAWRA und WEBB[7] über die Isolierung eines Hesperidin-Protein-Komplexes aus einem Wasserextrakt von Zitronenschalen. Dieser Komplex befand sich im Gleichgewicht mit Hesperidin, wobei die Chalkonform in alkalischer Lösung vorherrschte. Sie berichteten, daß Hesperidinchalkon die Kapillarbrü-

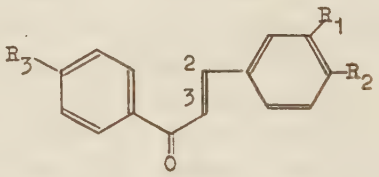
---

2) A.SZENT-GYÖRGYI, Dtsch.med.Wschr. 62, 1325 (1936), Nature 138, 27, 798 (1936)
3) ST.HUSZAK, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chemie 249, 214 (1937)
4) J.LAVOLLAY u. M.CHIRAY, La Revue du Foie 1, 53 (1942)
5) J.LAVOLLAY u. J.L.PARROT, Ann.pharmac.franc. 1, 39 (1939)
6) R.H.HIGBY, J.Amer.pharmac.Assoc. 32, 74 (1943)
7) C.Z.WAWRA u. I.L.WEBB, Science (New York) 96, 302 (1942)

chigkeit vermindere und daß der Proteinkomplex leicht oxydiert und reduziert werden könne. Deshalb sei es möglich, daß die Verbindung in einem E n z y m s y s t e m eine Rolle spiele. Um eine Inaktivierung durch Rückbildung von Hesperidin zu vermeiden, schlägt HIGBY[8] eine partielle Methylierung in Stellung 2 vor. Diese Verbindung soll immer noch aktiv sein.

Zu einer gegenteiligen Aufforderung kommt SCARBOROUGH[9]. Nach ihm soll auch dem reinen Hesperidin per os verabreicht eine gewisse Wirksamkeit zukommen, da es im Organismus in die aktive Form umgewandelt werden kann. Aus seinen Versuchen zieht er den Schluß, daß die Aktivität von Hesperidin und Hesperetin von gewissen wasserlöslichen Extrakten übertroffen wird.

1946 veröffentlichten HUGHES und PARKES[10] ihre Versuche zur Herstellung synthetischer wirksamer Verbindungen, die neue Gesichtspunkte brachten. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß Chalkone folgender Struktur wirksam sein können.




Formelbild 1

Dagegen verschwand die Wirksamkeit, wenn die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 hydriert wurde. In der Folge wurden von HUGHES und PARKES[10] leicht wasserlösliche Chalkonglykoside und Phosphorsäureester hergestellt, die alle stark aktiv waren.

Bezüglich des Wirkungsmechanismus ziehen BEILER und MARTIN[11] die Möglichkeit in Betracht, daß die Wirkung von Hesperidin und Eriodictin auf einer Hemmung der H y a l u r o n i d a s e beruhen könne, da die Hyaluronidase nach DURAN-REYNALS[12] die Permeabilität des Bindegewebes steigert.

---

8) R.H.HIGBY, J.Amer.pharmac.Assoc. 32, 74 (1943)
9) H.SCARBOROUGH, Biochem.J. 39, 271 (1945)
10) E.G.HUGHES u. W.M.PARKES, Festschrift Emil Barell 216 (1946)
11) J.M.BEILER u. G.J.MARTIN, J.biol.Chemistry 171, 507 (1947)
12) F.DURAN-REYNALS, Yale J.Biol.and Med. 11, 601 (1939)

Eine auffallend starke Hemmung wurde durch die gleichzeitige Anwesenheit von Vitamin C u n d Bioflavonoiden erzielt, wenn auch letztere nur in kleinen Mengen vorhanden sind.

Bekanntlich ist das Vitamin C allein schon bei s k o r b u t i s c h e n Hämorrhagien wirksam. Daß die Bioflavonoide diese antihämorrhagische Wirkung verstärken, wäre demnach die plausibelste Erklärung. Ausgehend von diesen Vorstellungen betraehtete man daher eine entsprechende Kombination als brauchbares Therapeutikum bei Erkältungskrankheiten. Allerdings gehen hier die Ansichten wieder stark auseinander. Während TEBROCK[13] sowie PEARSON[14] geringe oder gar keine Wirkungen feststellen konnten, berichteten BISKIND und MARTIN[15] über gute Erfolge mit der Kombination von Citrusbioflavonoiden und Ascorbinsäure bei a k u t e n I n f e k t i o n e n der Atmungsorgane. Die pharmakologische Wirkung der Bioflavonoide wird dabei mit ihrer Fähigkeit Protein-Komplexverbindungen zu bilden, erklärt[16]. KÜHNEN[17] nimmt sogar an, daß die Bioflavonoide in der Lage sind, die prostethische Gruppe eines Atmungsfermentes zu binden.

In ähnlicher Weise empfehlen HÜLLSTRUNG und HACK[18] Bioflavonoide bei H e u f i e b e r und a l l e r g i s c h e n Ekzemen.

SOKOLOFF und Mitarbeiter[19] behandelten zahlreiche Patienten, die bei verschiedenen Indikationen einer R ö n t g e n t i e f e n t h e r a p i e unterzogen werden mußten mit Tagesdosen von 300 - 600 mg Hesperidin per os 5 Tage vor der Bestrahlung und anschliessend während der ganzen Dauer der Bestrahlung. Die Kranken zeigten eine deutliche Abschwächung des erwarteten Hauterythems, in einigen Fällen sogar überhaupt keinerlei Reaktionen. An isolierten Lebermitochondrien, die außerordentlich strahlenempfindlich sind, entfaltet Hesperidin[20] einen Schutz gegen eine strahleninduzierte Enzymschädigung.

---

13) H.E.TEBROCK, J.Amer.med.Assoc. 162, 1227 (1956)
14) W.N.PEARSON, J.Amer.med.Assoc. 15, 1675 (1957)
15) M.S.BISKIND u. W.C.MARTIN, Amer.J.Digest.Diseases 22, 41 (1955)
16) C.Z.WAWRA u. I.L.WEBB, Science (New York) 96, 302 (1942)
17) J.KÜHNEN, Merck's Iber 61/62, 8 (1949)
18) H.HÜLLSTRUNG u. K.HACK, Dermatol.Wschr. 31/32, 447 (1943)
19) K.J.SOKOLOFF, clin.Invest. 4, 395 (1951)
20) H.FRITZ-NIGGLI, Fortschr.Gebiete Röntgenstrahlen verein.Röntgenprax. 86, 477 (1957)

Bei der toxischen D i p h t h e r i e [21] kam die gefäßabdichtende und antitoxische Wirkung des Citrins in überraschender Weise zur Geltung. Durch die kombinierte Behandlung mit Citrin, Vitamin C und Calcium konnten im Blut kreisende Toxine am Übertritt ins Gewebe gehindert werden und somit toxische Organschäden verhütet werden.

CATEL und KOHL[22] sahen bei Kindern mit Pachymeningitis hämorrhagica interna durch Citringaben auffällige Erfolge. RAUNERT[23] konnte urologische Blutungen nach Schleimhautentzündungen und Verletzungen besonders nach operativen Eingriffen günstig beeinflussen.

Auch bei Lungenblutungen werden Bioflavonoidgaben empfohlen. BROCK[24] gibt bei schweren Verbrühungen im Kindesalter sofort neben der üblichen Behandlung routinemäßig Citrin.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die B i o f l a v o n o i d e allein oder in Verbindung mit Vitamin C über einen Kapillar abdichtenden Effekt verfügen und sich therapeutisch bei Hämorrhagien, akuten Infektionen, Strahlenschäden und anderen allergischen Prozessen gut bewährt haben.

---

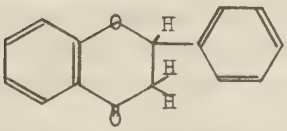
21) R.KOEHLER, Dtsch.Gesundheitswes. 10, 122 (1947)
22) J.CATEL u. H.KOHL, Mschr.Kinderheilkunde 5/6, 86 (1941)
23) K.RAUNERT, Z.Urol. 32, 630 (1941)
24) H.BROCK, Kinderärztliche Prax. 8, 353 (1951)

## C. ZUR ANALYTIK DER BIOFLAVONOIDE

Zu den wichtigsten Bioflavonoiden gehören die Glykoside Hesperidin, Naringin und die Aglykone Hesperetin, Naringenin, Eriodictyol und Homoeriodictyol.

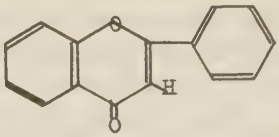
Chemisch zählen sie zur Gruppe der Flavanone (I), die sich von den bekannten Flavonen (II) und Flavonolen durch den teilweise hydrierten γ-Pyronring unterscheiden.

Formelbild 2



(I)

Formelbild 3

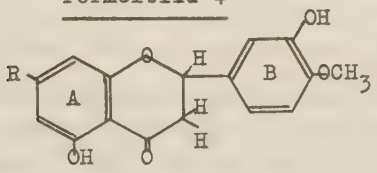


(II)

Man erhält sie aus den entsprechenden Flavon- bzw. Flavonolderivaten durch katalytische Hydrierung oder auf synthetischem Wege durch Kondensation von Acetophenonen mit substituierten aromatischen Aldehyden und nachfolgendem Ringschluß.

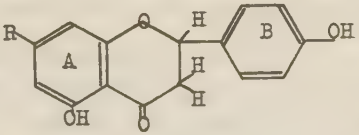
Strukturell unterscheiden sie sich nur durch unterschiedliche Substitution im A- oder B-Ring bzw. durch die Zuckerstellung. Aus einer Formelübersicht sind die Strukturverhältnisse der einzelnen im Folgenden näher untersuchten Bioflavonoide ersichtlich.

Formelbild 4



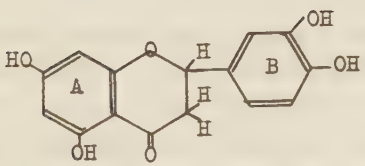
Hesperetin R = H
Hesperidin R = O-Rhamnoglucose

Formelbild 5



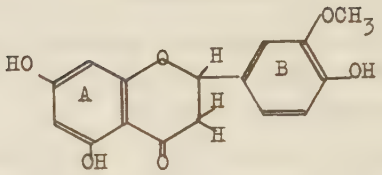
Naringenin R = H
Naringin R = O-Rhamnoglucose

Formelbild 6




Eriodictyol

Formelbild 7




Homoeriodictyol

Da für die Ausarbeitung von quantitativen Analyseverfahren entsprechende Reinsubstanzen Vorbedingung waren, wurden von uns alle in Frage kommenden Substanzen vorwiegend aus Citrusfrüchten isoliert und die Identität und Reinheit durch CH-, $OCH_3$-Analyse festgestellt. (siehe Versuchsteil Seite 50-55 ).

Über die bereits bekannten analytischen Daten hinaus wurde, soweit erforderlich, ihr papierchromatographisches und spektrophotometrisches Verhalten untersucht und mit Struktur und Reaktionsweise in Verbindung gebracht.

## I. Farbreaktionen und Papierchromatographie der Bioflavonoide aus Citrusfrüchten

Nach SHINODA[25] ergeben alle Flavanone oder vorgereinigte Pflanzenextrakte, die diese enthalten, mit alkoholischer Lösung von Magnesium und konz. Salzsäure eine purpur- bis violett-rote Färbung. Dieser Test dient meist zur schnellen Orientierung.

Während man Flavone und Flavonole papierchromatographisch meistens an einer charakteristischen Eigenfärbung im Sichtbaren oder durch ihre Fluoreszenz im UV-Licht erkennen kann, sind die Flavanone farblos und treten im UV-Licht nicht oder nur schwach in Erscheinung. Erst durch Besprühen mit der von SHIBATA[26] vor-

25) J.SHINODA u. M.INUBUSE, J.pharmac.Soc.Japan 48, 119 (1928)
26) S.SHIBATA u. A.KASAHARA, J.pharmac.Soc.Japan 72, 1386 (1952)

geschlagenen alkoholischen Magnesium-Azetatlösung ergeben die Flavanone eine charakteristische blaugrüne Fluoreszenz. Diese tritt nicht auf, wenn die OH-Gruppe am C-5 Atom methyliert oder azetyliert ist. Versuche durch Verwendung von Barium- und Strontiumsalzen stärker gefärbte Chelate zu finden, fielen negativ aus.

Auch nach Einwirkung von Alkalien blieben die Flavanone im sichtbaren Licht farblos. Im UV-Licht ist die Änderung der Farbtöne fluoreszierender Flecken, wenn man Ammoniakdämpfe einwirken läßt, typisch. Flavanone werden als schwach gelbe Flecken sichtbar, während beispielsweise die Katechine eine schwach blaue Fluoreszenz geben.

Mit Antimon-III-chlorid gibt Hesperidinmethylchalkon eine Rot- bis Rotviolettfärbung, während die übrigen Flavanone keine Reaktion zeigten.

Verschiedene Flavanone, wie Sakuranetin, geben mit konz. Salpetersäure blaue Flecke, nicht dagegen Hesperidin, Naringin und Homoeriodictyol.

Das kürzlich von NEU[27)] verwendete Rhodamin B gibt mit Flavanonen und Flavanolen eine charakteristische Blaufärbung[27)] und kann zur Unterscheidung der Flavanone bzw. Flavanole von den anderen Flavonkörpern herangezogen werden.

In der Tabelle 1 sind die Farbreaktionen der einzelnen Flavanone bei Anwendung der verschiedensten Sprühreagentien aufgeführt:

---

27) R.NEU, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 431 (1959)

Tabelle 1

| Flavanon-verbindung | Eigenfarbe | | Ammoniak Soda | | Aluminium chlorid | | bas.Blei azetat | | normal Bleiazet. | | Eisen-III chlorid | | alkoh. Magn. azet. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | TL | UV | TL | UV | TL | UV | TL | UV | TL | UV | TL | UV | TL | UV |
| Hesperidin | hG | BBr | - | G | hG | BW | - | RBr | G | BW | - | - | - | BGr |
| Hesperetin | - | hG | - | GGr | GW | Gr | - | Br | - | Br | Br | - | - | BGr |
| Hesperidin-methylchalk. | - | - | - | - | O | G | O | G | - | hG | - | - | - | BGr |
| Naringin | - | hG | - | G | - | BW | - | GGr | - | BW | Br | - | - | BGr |
| Naringenin | - | - | - | GGr | - | - | - | - | - | - | Br | - | - | BGr |
| Homoerio-dictyol | - | hG | - | hG | - | - | G | GGr | - | hG | Br | - | - | BGr |

Erläuterung zu Tabelle 1:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TL | = | Tageslicht | Gr | = | grün |
| UV | = | Ultraviolettes Licht | B | = | blau |
| h | = | hell | O | = | orange |
| G | = | gelb | Br | = | braun |
| W | = | weiß | | | |

BATE-SMITH und WESTALL[28] stellten für Flavone einige Regeln über die Beziehung zwischen chemischer Struktur auf. Was das chromatographische Verhalten der einzelnen Flavanone in den üblichen Lösungsmittelsystemen betrifft, so gelten die gleichen Gesetzmäßigkeiten, wie sie BATE-SMITH[28] für Flavone in Abhängigkeit zur Struktur aufgestellt hat. Eine Ausnahme macht nur das Flavanonrhamnosid ähnlich dem Flavonolrhamnosid Quercitrin.

28) E.C.BATE-SMITH u. R.G.WESTALL, Biochim.biophys.Acta (Amsterdam) 4, 427 (1950)

Die $R_f$-Werte erhöhen sich mit abnehmender Zahl der OH-Gruppen bzw. bei Einführung einer $OCH_3$-Gruppe, wie dies aus der Tabelle 2 ersichtlich ist.

Tabelle 2

| Flavanonverbindung | n-Butanol Essigsäure Wasser 4:1:5 | Äthylazetat wassergesättigt | m-Kresol Essigsäure Wasser 50:2:48 | Essigsäure Wasser 15:85 | Essigsäure Wasser 6:4 | Phenol Wasser 73:27 | Wasser |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $R_f$ | $R_f$ | $R_f$ | $R_f$ | $R_f$ | $R_f$ | $R_f$ |
| Hesperidin | 0.58 | 0.12 | 0.67 | 0.80 | 0.88 | 0.86 | 0.49 |
| Hesperetin | 0.90 | 0.97 | 0.95 | 0.50 | - | 0.95 | 0.13 |
| Hesperidinmethylchalk. | 0.81 | 0.79 | - | 0.98 | 0.89 | - | - |
| Naringin | 0.71 | 0.51 | 0.56 | 0.80 | 0.88 | 0.80 | 0.61 |
| Naringenin | 0.92 | - | 0.88 | - | - | 0.93 | 0.17 |
| Homoeriodictyol | 0.90 | 0.97 | 0.96 | 0.55 | 0.80 | 0.96 | 0.17 |
| Eriodictyol | 0.61 | - | 0.16 | - | - | - | - |
| Hesperidin-7-glucosid | 0.67 | - | - | - | - | - | - |

Für die nachfolgende quantitative Bestimmung war besonders das Löslichkeitsverhalten der Flavanone von Interesse. Bedingt durch den teilweise hydrierten C-Ring ist die Löslichkeit der Flavanone im Wasser allgemein geringer als bei den Flavonen. Mit Ausnahme von Naringin sind sie alle, auch bei 100° in Wasser praktisch unlöslich. Eine Übersicht wird in Tabelle 3 gegeben.

Tabelle 3

| Flavanon-verbindung | Schmelz-punkt | $\alpha_D^{18}$ | Wasser C 20° | Wasser C 100° | Alkohol | Benzol | Äther | Alkali | Chloroform | Pyridin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hesperidin | 251-252° | -73.3° (Pyridin) | ul | ul | ul | ul | ul | ll | ul | ll |
| Hesperetin | 227-229° | -37.6° (Äthanol) | ul | ul | ll | sl | sl | l | - | - |
| Naringin | 171° | -82.1° (Äthanol) | 1: 8000 | ll | ll | ul | ul | ll | ul | - |
| Naringenin | 248-251° | - | ul | ul | ll | ll | ll | ll | - | - |
| Homoerio-dictyol | 223-225° | -28.2° (Äthanol) | ul | ul | sl | ul | - | - | ul | - |

Erläuterung: ul = unlöslich
sl = schwer löslich
l = löslich
ll = leicht löslich

## II. UV-spektrophotometrische Untersuchungen

Die quantitative Bestimmung der Bioflavonoide mit Hilfe der Spektrophotometrie bzw. Kolorimetrie setzt die Kenntnis ihres spektralen Verhaltens, namentlich im alkalischen Milieu voraus. Wichtig war hierbei die Feststellung, wann die einzelnen Bioflavonoide zu den eingangs erwähnten Chalkonen aufgespalten werden.

a) Spektren in äthanolischer Lösung:

Während die Flavone im allgemeinen über zwei Maxima im Bereich von 240 - 270 mμ und von 300 - 350 mμ verfügen, besitzen die Flavanone nur ein stark ausgeprägtes Maximum, und zwar die Aglykone bei 290 mμ und die Glykoside bei 284 mμ zusätzlich einer Inflexion bei 340 mμ (siehe Abbildung 1 und Tabelle 4). Eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Kurvenverlauf der Isoflavone (siehe Abbildung 2) ist abgesehen von dem etwas hypsochrom verschobenem Maximum unverkennbar. Als Ursache ist das Fehlen des Chalkon-Chromophors in beiden Verbindungstypen und die dadurch bedingte weitgehende Unterbindung von mesomeren Strukturen anzuführen. Abbildung 2 zeigt zum Vergleich das Spektrum eines Flavons (Luteolin), Flavanons (Hesperetin) und Isoflavons (Genistein).

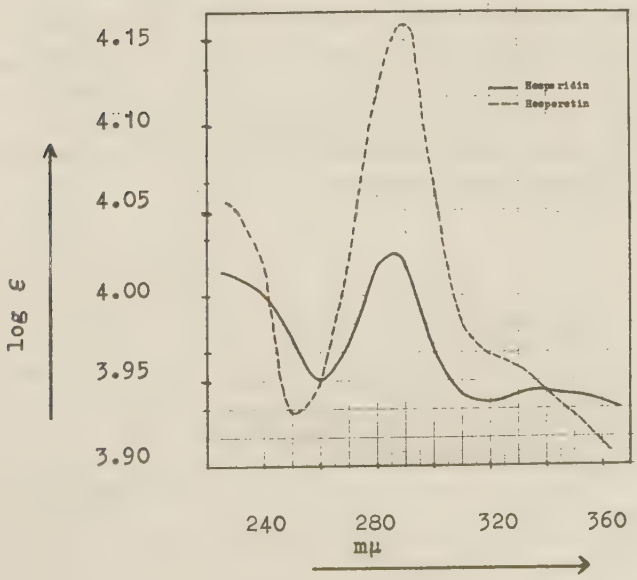



Abb. 1

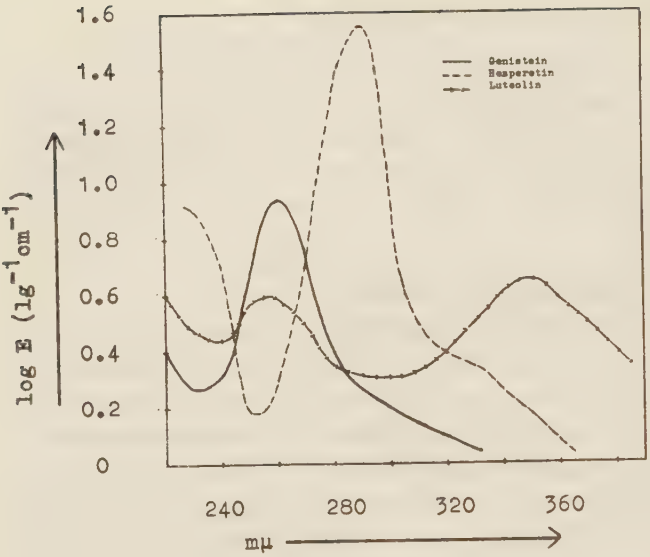



Abb. 2

b) UV-Spektren nach Zusatz von Komplexbildern und Natriumazetat:

Während auf Zusatz von n/100 Magnesiumazetat und n/100 Aluminiumchloridlösung in den Flavanonspektren eine bathochrome Verschiebung der Maxima um durchschnittlich 5 - 10 mμ stattfindet, und ein neues Maximum bei 370 mμ auftritt, bleiben die Spektren im Natriumazetatmilieu praktisch unverändert. Abbildung 3 zeigt das Spektrum von Naringin und Naringenin nach Zusatz von n/100 Magnesium- und Natriumazetatlösung. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Spektren und Spektrenverschiebungen der anderen Flavanone.

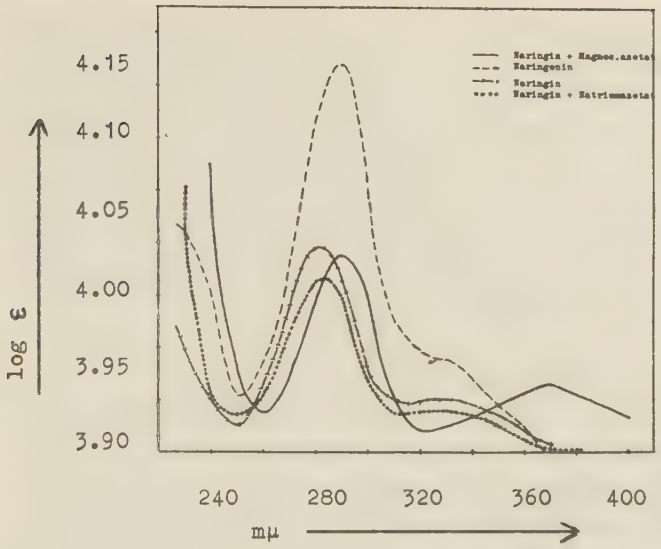



Abb. 3

Tabelle 4

| Flavanon-verbindung | Äthanol | | + n/100 Magnes. azetat oder + n/100 Alumin. chloridlösung | | mμ | + n/100 Natrium-azetatlösung | | △ mμ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $Max_I$ mμ | $Max_{II}$ mμ | $Max_I$ mμ | $Max_{II}$ mμ | | $Max_I$ mμ | $Max_{II}$ mμ | |
| Hesperidin | 284 | (340) | 290 | 370 | +6 | - | - | - |
| Naringin | 284 | (340) | 290 | 370 | +6 | 284 | (325) | ± 0 |
| Hesperetin | 290 | - | 295 | 370 | +5 | 290 | (325) | ± 0 |
| Naringenin | 290 | - | 295 | 370 | +5 | - | - | - |
| Homoeriodic-tyol | 290 | - | 295 | 370 | +5 | 290 | (325) | ± 0 |
| 5,7,4',3'-tetramethoxy-flavanon | 290 | - | 290 | - | ±0 | - | - | - |

Die Bathochromverschiebung auf Magnesium- und Aluminiumchloridzusatz beruht auf einer Chelatbildung zwischen der Carbonylgruppe und der benachbarten Hydroxylgruppe am $C_5$, denn bei dem 5,7,3',4'-tetramethoxyflavanon erfolgt keine Verschiebung. Warum Natriumazetat keine Veränderung bewirkt, im Gegensatz zu den analogen Flavonen, beruht wiederum auf der nur geringen Ausbildung von mesomeren Grenzstrukturen im Flavanonmolekül und der hieraus resultierenden geringen Neigung der OH-Gruppen Protonen abzugeben.

c) UV-Spektren nach Alkalizusatz:

Die Aufspaltung von Flavanonderivaten in alkalischen Milieu und die Rückführung von Hydroxychalkonderivaten in die entsprechenden Flavanone durch Säurezusatz ist seit langem bekannt. In beiden Fällen wird ein mehrstündiges Kochen mit Kalilauge bzw. Salzsäure und Schwefelsäure vorgeschlagen. REICHEL[29] führte diese Aufspaltung unter milden Bedingungen bei 37° C und schwach saurer bzw. alkalischer Reaktion durch. JENTSCH und FUCHS[30] verfolgten bei Hesperidin und Hesperetin die Aufspaltung zum Chalkon spektrophotometrisch. Sie verglichen dabei Hesperidin (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-rhamnoglucosid) mit Diosmin (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxy-flavon-7-rhamnoglucosid) und Hesperetin (5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanon) mit Phlorizin(2,4,6-trihydroxy-β-(p-hydroxy-phenylpropiophenon)-2-β-D-glucosid und fanden, daß Hesperidin im Gegensatz zum Hesperetin bereits beim Auflösen in n/100 Kalilauge in die Chalkonform übergeht. Wir erweiterten diese Untersuchungen durch entsprechende Messungen am Naringin (5,4'-dihydroxyflavanon-7-rhamnoglucosid), Naringenin (5,4'-dihydroxyflavanon) und Homoeriodictyol (5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavanon). Für die Beantwortung der Frage, ob sich die Chalkonform auch beim Naringin, Naringenin und Homoeriodictyol unter gleichen Bedingungen bildet wie beim Hesperidin bzw. Hesperetin können die UV-Kurven herangezogen werden (siehe Abb. 5). Nach Abbildung 5 entspricht das Naringin in seinem

29) L.REICHEL u. W.BURKHART, Ber.dtsch.chem.Ges. 74, 1802 (1941)
30) K.JENTSCH u. R.FUCHS, Österr.Chemiker Ztg. 50, 9 (1949)

optischen Verhalten völlig dem des Diosmins. Die beiden Maxima liegen bei 284 mμ und 358 mμ. Das Spektrum des Homoeriodictyols zeigt nach Alkalizusatz ein davon völlig verschiedenes Verhalten. Das in alkoholischer Lösung bei 290 mμ liegende Maximum ist im alkalischen Milieu nach 318 mμ verschoben ohne gleichzeitige Ausbildung eines weiteren Maximums im Bereich von 350 oder 360 mμ. Die Bathochromie und geringfügige Hyperchromie läßt sich durch Salzbildung erklären. Ebenso liegen die Verhältnisse beim Naringenin. Ein Übergang in die Chalkonform durch bloßes Auflösen in Lauge ist hier somit mit Sicherheit nicht eingetreten. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Lage der Maxima.

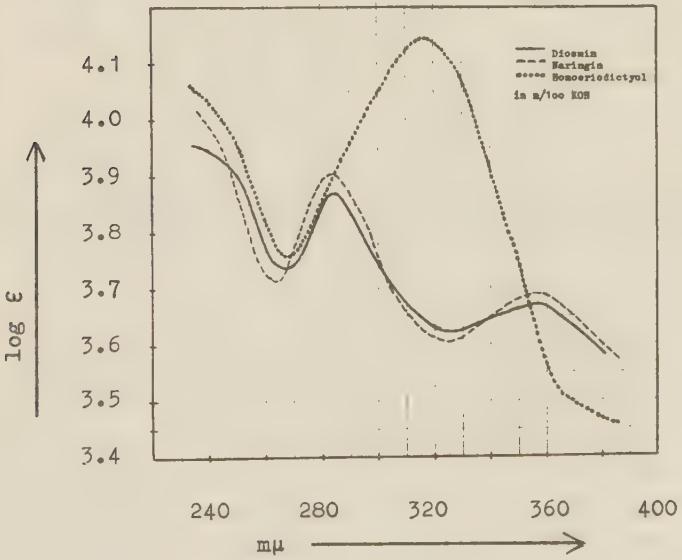



Abb. 5

Die Rückbildung des Flavanons aus Hesperidin bzw. Naringinchalkon erfolgt dagegen nur sehr langsam, da sich nach dem Ansäuern der alkalischen Lösung erst nach längerer Zeit das in Wasser praktisch unlösliche Flavanon ausscheidet.

Die leichte Aufspaltbarkeit der Flavanonglykoside im Gegensatz zu den Flavanonaglykonen ist wohl damit zu erklären, daß

bei den Glykosiden in Folge der Blockierung der C-7 Position keine Resonanzstabilität möglich ist, die bei Flavanonen praktisch nur durch OH-Substitution am C-7 und im Seitenphenyl erreicht werden kann. Diese Deutung stimmt überein mit Befunden von FARKAS und VARADY[31] bei der Synthese von Tectorigenin (5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyisoflavon).

T a b e l l e 5

| Flavanon-verbindung | Alkohol | | n/100 KOH | |
|---|---|---|---|---|
| | $Max_{I}$ mμ | $Max_{II}$ mμ | $Max_{I}$ mμ | $Max_{II}$ mμ |
| Naringin | 284 | (340) | 284 | 358 |
| Hesperidin | 284 | (340) | 284 | 358 |
| Naringenin | 290 | - | 318 | - |
| Hesperetin | 290 | - | 318 | - |
| Homoeriodictyol | 290 | - | 318 | - |
| Diosmin | - | - | 284 | 358 |

31) L.FARKAS u. J.VARADY, Symp. über Naturstoffe, Budapest, November 1959

## III. Bisherige Methode zur quantitativen Bestimmung von Flavanonen in Citrusfrüchten

HARVEY und RYGG[32)33)] versuchten erstmals eine quantitative Bestimmung durch Verwendung von Eisen-III-chlorid. Diese Methode läßt sich wohl auf die Flavanone in der farblosen Albadoschicht anwenden, nicht aber zur Bestimmung des Glykosidgehaltes im Preßsaft der Orange, Zitrone und Grapefruit, da hier die vorhandene Zitronensäure mit Eisen-III-chlorid unter Rotfärbung reagieren würde.

Das Verfahren nach POORE[34)], das auf einer gravimetrischen Bestimmung der Bioflavonoide beruht, ist sehr zeitraubend und daher, abgesehen von der Ungenauigkeit der Methode, für die Praxis nicht geeignet.

Die Borsäuremethode nach WILSON[35)] ist nur auf Hesperidin anwendbar, ebenso die Gibbs-Reaktion[36)], die mit Naringin keine eindeutige Farbreaktion ergibt.

ROWELL und WINTER[37)] reduzierten die Flavanone mit Hilfe von Natriumborhydrid zu dem analogen Anthocyanidin und photometrierten nach Salzsäurezusatz die dabei auftretende rote Farbe. Dieses Verfahren ist zur Bestimmung von Reinsubstanzen und von Arzneimitteln, die diese enthalten anwendbar, sofern diese Arzneimittel wenig andere Begleitstoffe enthalten. Eine Vorschrift zur Bestimmung der Flavanone in Citrusfrüchten fehlt.

Bei der auf Seite 16 erwähnten Aufspaltung zum Chalkon mit Alkalien werden die Citrusbioflavonoide deutlich gelb gefärbt. Auf dieser Eigenschaft fußt das bis heute fast ausschließlich angewandte Verfahren, Citrusbioflavonoide quantitativ zu bestimmen. Es stammt von DAVIS[38)], der die Flavanone in Äthylen-

32) E.M.HARVEY u. G.L.RYGG, Plant.Physiol. 11, 463 (1936)
33) E.M.HARVEY u. G.L.RYGG, Plant.Physiol. 13, 571 (1938)
34) H.D.POORE, Ind.Engng.Chem. 26, 673 (1934)
35) C.W.WILSON, J.Amer.chem.Soc. 61, 2303 (1936)
36) H.D.GIBBS, J.biol.Chemistry 72, 649 (1927)
37) K.M.ROWELL u. D.H.WINTER, J.Amer.pharmac.Assoc. 48, 12746 (1959)
38) W.B.DAVIS, Analytic.Chem. 19, 476 (1947)

glycollösung nach Zusatz von NaOH kolorimetrisch bestimmt. Diese Methode ist rasch durchzuführen, doch liefert sie bei der quantitativen Bestimmung von Flavanonen in Citruspreßsäften ohne vorherige Abtrennung der Begleitstoffe ungenaue Werte. Außerdem sind in der Zwischenzeit aus Citrusfrüchten eine Reihe von Flavonderivaten isoliert worden, die nicht in die Gruppe der Flavanone gehören, d.h. Bioflavonoide darstellen, aber alle in alkalischer Lösung mehr oder minder starke Gelbfärbungen geben[39)40)41)42)].

Um diese erheblichen Fehlerquellen auszuschalten, haben wir uns die Aufgabe gestellt, die durch Flavone und andere Begleitstoffe hervorgerufenen Farbreaktionen dadurch zu umgehen, daß wir die wesentlich spezifischere H y d r a z o n b i l d u n g der Flavanone zur Bestimmung heranzogen.

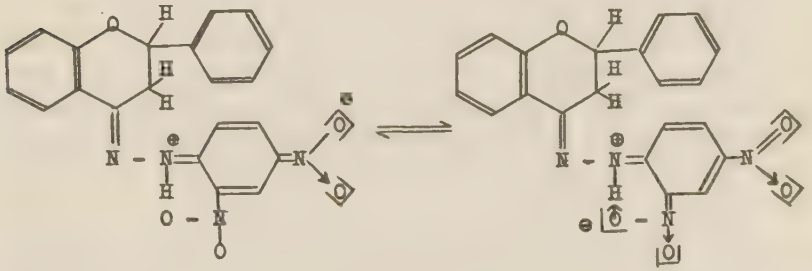
## IV. Darstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Citrusbioflavonoide

1951 wurden von DOUGLASS, MORIS und WENDER[43)] zum ersten Mal die DNPH einiger Flavanone hergestellt. Da wir die 2,4-DNPH der Flavanone zur spektrophotometrischen Untersuchung, Papierchromatographie und namentlich zur Aufstellung von Testkurven in reiner kristalliner Form benötigten, stellten wir sie nach einer Methode her, die sich im wesentlichen an die von DOUGLASS, MORIS und WENDER[43)] gegebene Vorschrift anlehnte, aber hinsichtlicht der Mengenverhältnisse und der Reaktionstemperatur etwas verändert wurde. Die kristallinen Derivate waren durchweg rot gefärbt, schwer löslich in Alkohol, Äther und Azeton und leicht löslich in Dioxan unter Bildung gelb gefärbter Lösungen.

39) R.M.HOROWITZ, J.Org.Chem. 21, 1184 (1956)
40) R.M.HOROWITZ, J.Amer.chem.Soc. 79, 6561 (1957)
41) P.S.SARIN u. T.R.SERHADRI, Tetrahedron 8, 64 (1960)
42) R.M.HOROWITZ u. B.GENTILLI, J.Org.Chem. 25, 2183 (1960)
43) C.D.DOUGLASS, Q.L.MORIS u. S.H.WENDER, J.Amer.chem.Soc. 73, 4023 (1951)

Das Schema einer Kupplung ist aus Formelbild 8 und 9 ersichtlich. Die Schmelzpunkte sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Zur Chromatographie der Dinitrophenylhydrazone verwendeten wir die absteigende Methode und als Lösungsmittelsystem ein Gemisch bestehend aus Dioxan, Eisessig, Wasser (5:3:2). Dieses System wurde bereits von DOUGLASS, MORIS und WENDER[44] zur Auftrennung von Flavanondinitrophenylhydrazonen verwendet.

Als ein gutes Anfärbereagens erwies sich 10%ige alkoholische Kalilauge. Während reines 2,4-Dinitrophenylhydrazin eine gelb-braune Färbung ergibt, liefern alle Kupplungsprodukte blauviolette Farbtönungen. Als zweites sehr brauchbares Sprühreagens bewährte sich eine äthanolische Natriumäthoxydlösung mit der auf dem Papier noch $2 \times 10^{-5}$ g Dinitrophenylhydrazon nachgewiesen werden konnte.



Formelbild 8



Formelbild 9

44) C.D.DOUGLASS, Q.L.MORIS u. S.H.WENDER, J.Amer.chem.Soc. 73, 4023 (1951)

Tabelle 6

| 2,4 - Dinitrophenyl-hydrazon-Flavanonverbindung von: | Schmelzpunkt °C Kofler korr. | $R_f$-Wert |
|---|---|---|
| Hesperidin | 250 | 0.80 |
| Hesperetin | 293 (Z)*) | 0.81 |
| Naringin | 246 | 0.98 |
| Naringenin | 287 | 0.78 |
| Homoeriodictyol | 295 (Z)*) | 0.80 |

*) (Z) = unter Zersetzung

UV-Spektren

In alkoholischer Lösung zeigten alle Dinitrophenylhydrazone ein Hauptmaximum um 400 mμ, also etwa 60 mμ bathochromer als reines 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Die Lage der Maxima bei den einzelnen Flavanondinitrophenylhydrazonen geht aus Tabelle 7 hervor. Der Kurvenverlauf ist am Beispiel von Homoeriodictyd im Vergleich zu reinem 2,4-Dinitrophenylhydrazin und zum unverändertem Flavanon in Abbildung 6 gezeigt.

Versetzt man die Farblösungen mit 10%iger alkoholischer Kalilauge, so schlägt die gelbe Farbe in dunkelrot über, was sich in einer Verschiebung des Maximums um ca. 70 - 80 mμ in den langwelligen Bereich ausdrückt.

Hesperidin und Naringin liefern Maxima bei 470 mμ, Hesperetin, Naringenin und Homoeriodictyol bei 480 mμ. Da diese Rotfärbung relativ instabil ist, d.h. nach kurzer Zeit bereits in rotbraune Mischfarbe übergeht, mußten Bedingungen ermittelt werden, unter denen eine möglichst lange Stabilität des Farbstoffes gewährleistet war. Vor allem mußte eine eventuelle Auskristallisation des überschüssigen Dinitrophenylhydrazins unterbunden werden.

Tabelle 7

| 2,4 - Dinitrophenyl-hydrazon-Flavanonverbindung | Alkoholische Lösung $Max_I$ mμ | Alkalische Lösung $Max_I$ mμ |
|---|---|---|
| Hesperidin | 396 | 470 |
| Naringin | 396 | 470 |
| Hesperetin | 400 | 480 |
| Naringenin | 400 | 480 |
| Homoeriodictyol | 400 | 480 |
| reines 2,4-DNPH | 345 | - |

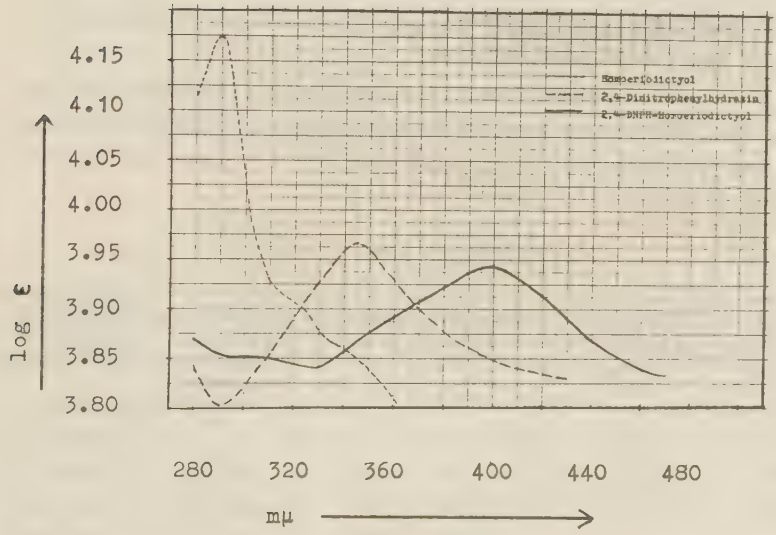



Abb. 6

## V. Ermittlung von geeigneten Versuchsbedingungen für eine spektrophotometrische Bestimmung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Flavanone

Neben der Ausbildung einer möglichst stabilen Farblösung mußte der genaue Konzentrationsbereich festgelegt werden, in welchem das Lambert-Beer'sche Gesetz noch erfüllt ist. Außerdem sollten noch Messungen von möglichst geringen Flavanonkonzentrationen durchführbar sein. Um diese Versuchsbedingungen festzulegen, wurden

1. die Konzentration der 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung verändert,
2. die Abhängigkeit der 2,4-Dinitrophenylhydrazinreaktion von der Zeit und der Temperatur untersucht,
3. die Konzentration der Kalilauge variiert und die Abhängigkeit der Komplexbildung von der Zeit der Kalilaugezugabe untersucht.

Im einzelnen wurden die in der folgenden Tabelle 8 aufgezeichneten Änderungen und Versuchsbedingungen gewählt. Die jeweiligen Versuchsansätze untersuchten wir in jedem Fall spektrophotometrisch.

Tabelle 8

| Konzentration der 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung | Menge der 2,4-DNPH-Lösung ml | Dauer der Reaktion | | | Zugabe der alkohol. Kalilauge in ml | Messung im Spektrophotometer |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 100° | 55° | 30° C | | |
| 0.5 % | 0.5 | 2' | 5' | 5' | 2 *) | sofort |
| 1.0 % | 1.0 | 5' | 10' | 10' | 4 *) | nach 5' |
| 2.0 % | 2.0 | 10' | 20' | 30' | 2 **) | nach 10' |
| | | | 50' | 60' | 4 **) | nach 20' |

*) Zugabe der alkoholischen Kalilauge sofort nach dem Ende der Reaktion

**) Zugabe der alkoholischen Kalilauge nach dem Erkalten des Reaktionsgemisches

Dabei erhielten wir folgendes Ergebnis:

Bei einer Reaktionstemperatur von 100°C genügten 2 - 5 Minuten, um eine quantitative Kupplung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit dem Flavanon zu erreichen, allerdings hat die hohe Temperatur den Nachteil, daß ein Teil des Lösungsmittels verdunstet. Bei 30°C Reaktionstemperatur dauert die Reaktion 2 - 3 Stunden, während bei 50 - 55°C die Reaktion nach etwa 50 Minuten beendet ist.

Die größte Farbstabilität ist gegeben, wenn das Verhältnis von Flavanon zu 2,4-DNPH 0.4:1 beträgt. Die stöchiometrisch berechnete Menge beträgt zum Beispiel bei Hesperetin : 2,4-DNPH 1.5: 1.

In keinem Falle wurden nach 5 Minuten eine Ausfällung beobachtet. Wie sich außerdem ergab, hat die Zugabe der Kalilauge erst nach dem Erkalten zu erfolgen. Die Messung selbst muß am zweckmäßigsten sofort, spätestens jedoch nach 5 Minuten nach Kalilaugezusatz durchgeführt werden, da auch bei dem oben gewählten Flavanon-Reagensverhältnis bereits nach 8 - 10 Minuten eine Ausfällung zu beobachten ist.

## VI. Aufstellung von 2,4-Dinitrophenylhydrazon-Flavanon Eichkurven mit dem Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q

Nach Festlegung der erforderlichen Versuchsbedingungen wurden mit den Substanzen Hesperidin, Hesperetin, Naringin, Naringenin und Homoeriodictyol entsprechende Eichkurven aufgestellt. Die Durchführung erfolgte in der Weise, daß zu jeweils 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 ml einer 1%igen Flavanonlösung die entsprechende Menge 2,4-DNPH-Lösung hinzugefügt wurde. Versuchsansätze wurden 50 Minuten bei 50 - 55°C erhitzt und nach dem Abkühlen mit 10%iger alkoholischer Kalilauge versetzt. Die Messung erfolgte sofort im Zeiss-Spektrophotometer gegen eine Blindlösung, die das Reagenz und die Kalilauge enthielt. Die Messung der Aglykone erfolgte bei 480 mμ, die der Glykoside bei 470 mμ.

Es wurden pro Versuchsreihe etwa 20 Messungen durchgeführt und die Mittelwerte zur Aufstellung der Eichgeraden verwendet. (siehe Tabelle 9).

Wie aus den Eichkurven hervorgeht (siehe Abbildung 7), erfüllen sie alle das Lambert-Beer'sche Gesetz. Errechnet man den Anstieg der jeweiligen Kurve nach der Formel

$$m = \frac{\Delta \text{ Extinktion}}{\Delta \text{ mg Flavanon}}$$

so erhält man für die jeweilige Gerade einen Faktor, der, mit der gemessenen Extinktion multipliziert, den Prozentgehalt an Flavanon ergibt.

Arbeitet man unter den angegebenen gleichen Bedingungen, so ergibt sich folgendes Ergebnis:

| | | |
|---|---|---|
| %-Gehalt einer Hesperidinlösung | = | 5.41 x Extinktion |
| %-Gehalt einer Hesperetinlösung | = | 2.35 x Extinktion |
| %-Gehalt einer Naringinlösung | = | 4.91 x Extinktion |
| %-Gehalt einer Naringeninlösung | = | 1.92 x Extinktion |
| %-Gehalt einer Homoeriodictyollösung | = | 2.62 x Extinktion |

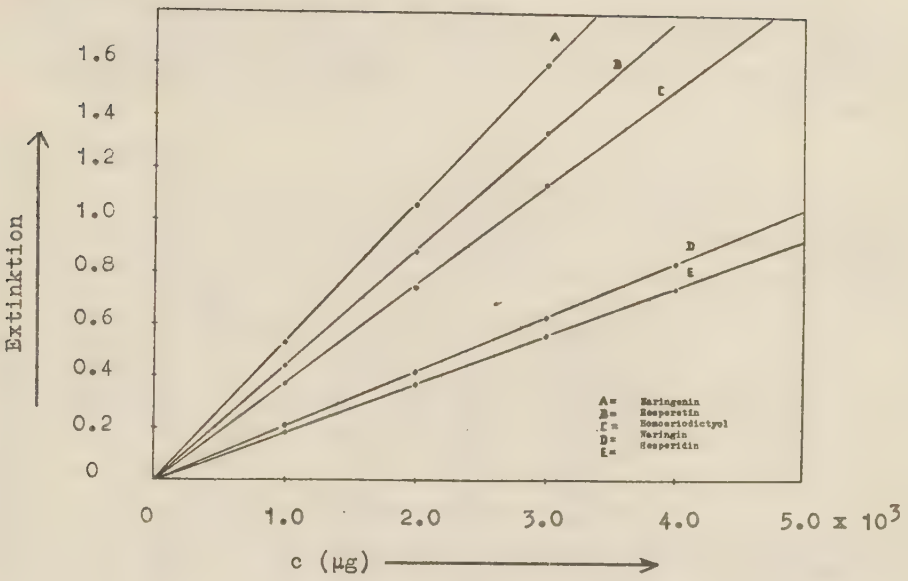



Abb. 7

Wie aus den Eichgeraden ersichtlich ist (Abb. 7), liegen diese für Naringin und Hesperidin sehr nahe beieinander, während die Eichgeraden der Aglykone voneinander erheblich abweichen. Es wird deutlich, daß die Farbintensität mit zunehmendem Molekulargewicht abnimmt, während der Unterschied zwischen den beiden Isomeren Homoeriodictyol und Hesperetin allein durch die OH- bzw. $OCH_3$-Substitution im Seitenphenyl bedingt sein muß.

Außerdem geht die Intensität der Farbbildung mit der Stabilität der Farblösungen parallel. Sämtliche Aglykone bilden wesentlich stabilere Farblösungen als die Glykoside, was sehr leicht damit erklärt werden kann, daß die Glykoside im alkalischen Milieu leichter in die Chalkonform übergehen, die offenbar der Hydrazonbildung entgegenwirkt.

Wie aus der durchgeführten Fehlerrechnung ersichtlich ist, (siehe Tabelle 10 und 11, Seite 30) beträgt der wahrscheinliche Fehler rund 0.8%. Daraus geht hervor, daß die Eichkurven den praktischen Anforderungen und den Ansprüchen des Laboratoriums genügen.

T a b e l l e 9

(Auszug aus dem Versuchsprotokoll)

| Substanz | Extinktionen | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Hesperidin | 1 mg | 2 mg | 3 mg | 4 mg | 5 mg |
| | 0.180 | 0.37 | 0.55 | 0.74 | 0.98 |
| | 0.178 | 0.36 | 0.56 | 0.77 | 1.00 |
| | 0.179 | 0.38 | 0.56 | 0.75 | 0.99 |
| | 0.180 | 0.37 | 0.55 | 0.73 | 0.97 |
| | 0.182 | 0.37 | 0.54 | 0.76 | |
| | 0.190 | 0.39 | 0.57 | 0.77 | |
| | 0.175 | 0.37 | 0.56 | 0.74 | |
| | 0.181 | 0.36 | 0.56 | 0.74 | |
| | 0.178 | 0.37 | 0.56 | | |
| Hesperetin | 0.44 | 0.88 | 1.30 | | |
| | 0.46 | 0.88 | 1.32 | | |
| | 0.46 | 0.88 | 1.33 | | |
| | 0.43 | 0.90 | 1.31 | | |
| | 0.44 | | | | |
| | 0.43 | | | | |
| | 0.44 | | | | |
| Naringin | 0.21 | 0.43 | 0.67 | 0.86 | |
| | 0.21 | 0.42 | 0.63 | 0.83 | |
| | 0.22 | 0.42 | 0.62 | 0.80 | |
| | 0.23 | 0.44 | 0.63 | 0.83 | |
| | 0.22 | 0.41 | 0.63 | 0.83 | |
| | 0.21 | 0.41 | 0.64 | 0.84 | |
| | 0.19 | 0.42 | | 0.82 | |
| | 0.22 | | | | |
| Naringenin | 0.53 | 1.06 | 1.64 | | |
| | 0.57 | 1.05 | 1.60 | | |
| | 0.51 | 1.05 | 1.62 | | |
| | 0.53 | 1.06 | 1.59 | | |
| | 0.53 | | 1.60 | | |
| Homoeriodictyol | 0.37 | 0.75 | 1.15 | 1.60 | |
| | 0.37 | 0.75 | 1.14 | 1.50 | |
| | 0.39 | 0.76 | 1.11 | 1.55 | |
| | 0.36 | 0.74 | 1.14 | 1.52 | |
| | 0.35 | 0.78 | 1.15 | 1.51 | |
| | 0.37 | | | | |
| | 0.35 | | | | |

Fehlerrechnung*)

Um zu zeigen, daß sich die mit dieser Methode erhaltenen Werte innerhalb geringer Fehlergrenzen bewegen, führten wir eine Fehlerrechnung durch.

Naringin

Wir wählten aus 100 Punkten 20 aus, berechneten nach der Formel (siehe Seite 26) den Anstieg und durch Teilung den Naringinfaktor.

Die folgenden 10 Quotienten heißen:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 10.0 | 10.2 | 11.0 | 10.3 | 10.5 | 9.5 | 9.8 | 9.5 | 10.4 | 10.8 |

sie ergeben die Zahlenwerte m =

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5.00 | 4.90 | 4.54 | 4.85 | 4.76 | 5.26 | 5.10 | 5.26 | 4.80 | 4.63 |

*) nach F.W.KÜSTER, A.THIEL; Verlag W.de Gruyter u.Co., Berlin (1955) S. 188 u. Tafel 12, I

Tabelle 10

| Nr. | m | M | f | $10^8 \times f^2$ | $f_m$ | $F_m$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5.00 | | +0.09 | 810 000 | | |
| 2 | 4.90 | | -0.01 | 10 000 | | |
| 3 | 4.54 | | -0.37 | 13 690 000 | | |
| 4 | 4.85 | | -0.06 | 360 000 | | |
| 5 | 4.76 | $\frac{49.10}{10}$ | -0.15 | 2 250 000 | $\sqrt{\frac{54270\ 000 \times 10^{-8}}{10-1}}$ | $\sqrt{\frac{54270\ 000 \times 10^{-8}}{10(10-1)}}$ |
| 6 | 5.26 | | +0.35 | 12 250 000 | | |
| 7 | 5.10 | =4.91 | +0.19 | 3 610 000 | $= \frac{0.73}{3} = 0.24$ | $= \frac{0.73}{9.5} = 0.07$ |
| 8 | 5.26 | | +0.35 | 12 250 000 | | |
| 9 | 4.80 | | -0.11 | 1 210 000 | | |
| 10 | 4.63 | | -0.28 | 7 840 000 | | |

| $f_w$ | $F_w$ |
|---|---|
| 2/3 x 0.24 = 0.16 | 2/3 x 0.07 = 0.04 |

Somit ist $E_m = 4.91 \pm 0.07$
$E_w = 4.91 \pm 0.04$

Erläuterung zu Tabelle 10:

m = Quotient
M = Mittelwertquotient
f = Fehler zum Mittelwert
$f_m$ = mittlerer Fehler der Einzelmessung
$F_m$ = mittlerer Fehler des Mittelwertes
$f_w$ = wahrscheinlicher Fehler der Einzelmessung
$F_w$ = wahrscheinlicher Fehler des Mittelwertes
$E_m = M \pm F_m$
$E_w = M \pm F_w$

In analoger Weise verfuhren wir auch bei den anderen Flavanonen. Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, liegen die wahrscheinlichen Fehler zwischen $\pm$ 0.6 und $\pm$ 0.9 %.

Tabelle 11

| Substanz | M | $10^8 \times f^2$ | $f_m$ | $F_m$ | $E_m$ | $E_w$ | in % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hesperidin | 5.41 | 17 710 000 | 0.14 | 0.04 | $5.41 \pm 0.04$ | $\pm$ 0.03 | $\pm$ 0.6 |
| Hesperetin | 2.35 | 7 490 000 | 0.09 | 0.03 | $2.35 \pm 0.03$ | $\pm$ 0.02 | $\pm$ 0.9 |
| Naringin | 4.91 | 4 428 000 | 0.24 | 0.07 | $4.91 \pm 0.07$ | $\pm$ 0.04 | $\pm$ 0.9 |
| Naringenin | 1.92 | 2 220 000 | 0.05 | 0.02 | $1.92 \pm 0.02$ | $\pm$ 0.01 | $\pm$ 0.6 |
| Homoeriodictyol | 2.62 | 9 510 000 | 0.10 | 0.03 | $2.62 \pm 0.03$ | $\pm$ 0.02 | $\pm$ 0.8 |

## VII. Aufstellung von Eichkurven mit dem Universalkolorimeter J nach LANGE

Da in der Praxis die kolorimetrische Bestimmung wesentlich einfacher durchzuführen ist, untersuchten wir die Möglichkeit, mit Eichgeraden auch hier eine geeignete Bestimmungsmethode zu finden. Wir benutzten hierzu den Universalkolorimeter J nach LANGE und führten die Messungen nach der Ausschlagmethode durch, wobei der Grünfilter VG 7 und 5 cm Glasküvetten zur Verwendung kamen.

Aufgestellt wurden nur Eichkurven von Hesperidin und Naringin, da jeweils eines dieser beiden Glykoside in den zu untersuchenden Preßsäften der Orange, Zitrone und Grapefruit vorkommt. Zur Aufstellung der Testkurven entnahmen wir nicht 0.1 ml wie bei der Spektrophotometrie, sondern 1 ml und füllten einen 100 ml Meßkolben bis zur Marke mit Aqua destillata auf. Auch hier wurden pro Versuchsansatz 10 Messungen durchgeführt (siehe Tabelle 12).

Wie aus den Eichkurven der Abbildung 8 hervorgeht, erfüllen diese zwar auch in dem angegebenen Bereich das Lambert-Beer'sche Gesetz, doch liegen die wahrscheinlichen Fehler zwischen 3 und 4% (siehe Tabelle 13).

T a b e l l e 12

(Auszug aus dem Versuchsprotokoll)

| Substanz | Extinktion | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.5 mg | 1.0 mg | 2.0 mg | 3.0 mg |
| Hesperidin | 0.08<br>0.07<br>0.09<br>0.08 | 0.130<br>0.140<br>0.125<br>0.135 | 0.190<br>0.180<br>0.185<br>0.185 | 0.245<br>0.250<br>0.250 |
| Naringin | 0.10<br>0.09<br>0.105<br>0.10 | 0.150<br>0.145<br>0.155<br>0.150 | 0.220<br>0.220<br>0.225 | 0.310<br>0.305<br>0.310 |

T a b e l l e 13

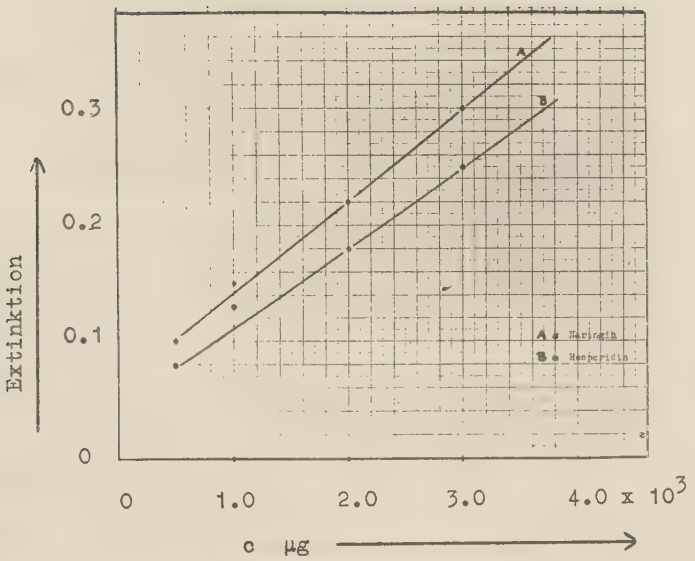
Fehlerrechnung

| Substanz | M | $10^8 \times f^2$ | $f_m$ | $F_m$ | $E_m$ | $E_w$ | in % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hesperidin | 12.0 | 1 952 000 000 | 1.4 | 0.46 | $12.0 \pm 0.46$ | $\pm$ 0.3 | 3 |
| Naringin | 10.0 | 2 998 000 000 | 1.6 | 0.56 | $10.0 \pm 0.56$ | $\pm$ 0.37 | 4 |

(Zeichenerklärung siehe Seite 30)

Bei höheren Konzentrationen an Dinitrophenylhydrazonen verliefen die Kurven nicht mehr geradlinig. Demnach ist die kolorimetrische Methode für Konzentrationsbestimmungen unter den angegebenen Versuchsbedingungen verglichen mit der spektrophotometrischen Methode n i c h t genau genug.

Abb. 8




## VIII. Quantitative Bestimmung von Flavanonen in Citrusfrüchten

Von praktischem Interesse ist die quantitative Bestimmung der Bioflavonoide in den Fruchtsäften von

| | | |
|---|---|---|
| | Citrus decumana L. | (Grapefruit) |
| | Citrus aurantium sin.L. | (Orange) |
| und | Citrus media L. | (Zitrone) |

Im einzelnen ergibt sich die Aufgabe, Naringin in der Grapefruit, Hesperidin in der Orange und Hesperidin zusammen mit Eriodictin*) in der Zitronen zu bestimmen.

Eine Vorbedingung für eine quantitative Bestimmung war zunächst die Anreicherung der Flavanone bzw. die Abtrennung der Begleitstoffe, sofern diese die Bestimmung störten.

*) R.M.HOROWITZ u. B.GENTILI bezeichnen Eriodictin als Eriocitrin, J.Org.Chem. 25, 2183 (1960)

Während bei der Grapefruit und der Orange einzelne Flavanone zu bestimmen waren, mußte im Falle des Zitronensaftes eine Gesamtflavanonbestimmung durchgeführt und auf Hesperidin bezogen werden, da eine Einzelbestimmung von Hesperidin und Eriodictin wegen des hierfür notwendigen komplizierten Trennverfahrens für die Praxis nicht in Frage kommt.

a) Ausarbeitung einer Bestimmungsmethode für Naringin im Saft von Citrus decumana L.

Wie die Chromatogrammkontrolle ergibt, läßt sich das Naringin dem Grapefruitsaft durch Ausschütteln mit Äthylazetat quantitativ entziehen. Allerdings empfiehlt es sich vorher die mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin reagierenden Bestandteile des ätherischen Öles durch eine Ätherextraktion zu beseitigen. Da das Äthylazetat als Ester ebenfalls mit 2,4-DNPH reagiert, und nach Kalilaugezusatz ein Maximum bei 425 mμ ergibt, mußte das Äthylazetat quantitativ entfernt werden. Daß dies möglich ist und Äthylazetat kein Störmoment darstellt, ergab folgender Modellversuch.

Wir lösten 20 mg reines Naringin in 100 ml Wasser, schüttelten 5 mal mit je 50 ml Äthylazetat aus, dampften das Äthylazetat ab, nahmen den Rückstand in 10 ml Methanol auf und bestimmten den Flavanongehalt nach der auf Seite 57 im Experimentellen Teil beschriebenen Weise.

Bei 0.2 ml Methanol-Stammlösung betrug die Extinktion 0.08, bei 0.4 ml 0.16. Nach der Naringineichkurve ergibt sich bei einer Extinktion von 0.16 ein Naringingehalt von 0.8 mg. Somit sind in 10 ml 20 mg Naringin enthalten. Damit ist gezeigt, daß Äthylazetat als Extraktionsmittel geeignet ist und zu keiner Störung führt.

In einem weiteren Versuch wurde der aus 3 Stück Grapefruit erhaltene Preßsaft (270 ml) in 3 mal 90 ml unterteilt, die erste Lösung direkt zur Extraktion verwendet, der 2. Portion 45 mg reines Naringin, der 3. Portion 90 mg reines Naringin zugesetzt und erst dann in gleicher Weise mit Äthylazetat extrahiert. Die Rückstände wurden in 9 ml Methanol aufgenommen, was ungefähr einer 0.5 - 1%igen Narin-

ginlösung entspricht. Dieses Volumverhältnis 1:10 von Meßlösung zu Preßsaft erwies sich für die quantitative Bestimmung des Naringins im Grapefruitsaft als günstigste Konzentration. Die Bestimmung ist auf Seite 57, die experimentellen Einzelheiten des Verfahrens, bezogen auf Grapefruitsaft auf Seite 58 angeführt. Tabelle 14 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Versuche.

T a b e l l e 14

1. Versuch

| Reiner Grapefruitsaft ohne Zugabe von Naringin | | | |
|---|---|---|---|
| Preßsaftmenge | 90 ml | | |
| Ausgangslösung (Methanol) | 9 ml | | |
| Davon entnommen | 0.1 ml | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.06 | 0.13 | 0.25 |
| mg Naringin nach Eichkurve | 0.3 | 0.6 | 1.2 |
| in 9 ml Ausgangslösung bzw. in 90 ml Saft sind enthalten (in mg Naringin) | 27 mg | 27 mg | 27 mg |
| Naringingehalt des Grapefruitsaftes | 30 mg / 100 ml | | |

2. Versuch

| Reiner Grapefruitsaft und Zugabe von 45 mg Naringin | | | |
|---|---|---|---|
| Preßsaftmenge | 90 ml | | |
| Ausgangslösung (Methanol) | 9 ml | | |
| Davon entnommen | 0.1 ml | 0.2 ml | |
| Extinktion | 0.17 | 0.35 | |
| mg Naringin nach Eichkurve | 0.83 | 1.7 | |
| Gefundene Gesamtnaringinmenge | 75 mg | 76 mg | |
| Theoretisch | 72 mg | | |

Fortsetzung Tabelle 14

3. Versuch

| Reiner Grapefruitsaft und Zugabe von 90 mg Naringin | | |
|---|---|---|
| Preßsaftmenge<br>Ausgangslösung | 90 ml<br>9 ml | |
| Davon entnommen<br>Extinktion<br>mg Naringin nach Eichkurve<br>Gefundene Gesamtnaringinmenge | 0.1 ml<br>0.27<br>1.3<br>118 mg | 0.2 ml<br>0.54<br>2.6<br>117 mg |
| Theoretisch | 117 mg | |

Wie aus den gefundenen Naringinmengen ersichtlich ist, ist die Methode auch auf Grapefruitsaft anwendbar. Daß in jedem Fall die zugesetzte Naringinmenge wiedergefunden wurde beweist, daß das Verfahren eine quantitative Bestimmung erlaubt und reproduzierbar ist. Die Fehler bewegten sich innerhalb der zulässigen Fehlergrenze.

b) Bestimmungsmethode für Hesperidin im Saft Citrus aurantium sin. L.

Ein Ausschütteln mit Äthylazetat wie bei der Grapefruit scheiterte an der Unlöslichkeit des Hesperidins.

Wir versuchten daraufhin das Hesperidin aus dem Saft durch Chromatographie an einer Perlonsäule abzutrennen. Als bestes Eluiermittel erwies sich Pyridin. Da das Pyridin aber auch noch andere flavonoide Substanzen mitlöst und bei der folgenden spektrophotometrischen Messung stört, war dieser Weg nicht gangbar. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, den Saft für die Bestimmung von störenden Begleitstoffen bzw. Schwebestoffen zu befreien und gleichzeitig damit das Hesperidin in Lösung zu bringen. Die ebenfalls mit DNPH reagierenden Bestandteile des ätherischen Öles können durch Ätherextraktion beseitigt werden. Zur Abtrennung der Pektinbestandteile kamen Erdalkalien in Frage. Während Versuche mit Kalilauge und Sodalösung wenig erfolgversprechend waren,

führte die Verwendung von Calciumhydroxyd zu einer Ausfällung von Pektinen und nach Filtration zu einer klaren Lösung.

Wie man durch Zusatz von reinem Hesperidin und anschließender Bestimmung zeigen kann, ist die Gesamtmenge des Hesperidins in dem Filtrat enthalten. Bei normalen Orangen ist das Filtrat gelb, bei Blutorangen grün gefärbt. Für die Extraktion des Hesperidins eignete sich Butanol. Allerdings mußte zuvor die wässrige Lösung mit Salzsäure schwach angesäuert werden. Die Butanollösung zeigt eine grüne Färbung, die bei Blutorangen rötlich war. Das Butanol wird bis fast zur Trockne abgedampft und anschließend die quantitative Bestimmung in üblicher Weise durchgeführt.

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu prüfen, versetzten wir reines Hesperidin mit Calciumhydroxyd und Wasser, säuerten mit Salzsäure schwach an, schüttelten mit Butanol aus und führten die DNPH Bildung durch. Bei einem weiteren Versuch wurde reines Hesperidin dem Orangensaft zugefügt.

T a b e l l e 15

1. Versuch

| Reiner Orangensaft ohne Zugabe von Hesperidin | | |
|---|---|---|
| Preßsaftmenge | 100 ml | |
| Ausgangslösung (Butanol) | 15 ml | |
| Davon entnommen | 0.1 ml | 0.2 ml |
| Extinktion | 0.130 | 0.245 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve | 0.7 | 1.35 |
| in 15 ml Ausgangslösung bzw. in 100 ml Saft sind enthalten (in mg Hesperidin) | 105 | 101 |
| Hesperidingehalt des Orangensaftes | 105 mg % | 101 mg % |

Fortsetzung Tabelle 15

2. Versuch

| Reiner Orangensaft und Zugabe von 100 mg Hesperidin | | |
|---|---|---|
| Preßsaftmenge | 100 ml | |
| Ausgangslösung (Butanol) | 21 ml | |
| Davon entnommen | 0.1 ml | 0.2 ml |
| Extinktion | 0.18 | 0.36 |
| mg Hesperidin nach der Eichkurve | 0.99 | 1.94 |
| Gefundene Gesamthesperidinmenge | 208 mg | 203 mg |
| Theoretisch | 205 mg | |

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich, war jede Bestimmung des Flavanons ohne große Fehler möglich. Die zugegebene Menge Hesperidin wurde in jedem Falle genau wiedergefunden.

So betrug die gefundene Gesamthesperidinmenge bei einem Versuch 208 mg, bei einem anderen Versuch 203 mg, während die berechnete Menge einen Wert von 205 mg ergab.

Die Bestimmung ist auf Seite 57 und die experimentellen Einzelheiten des Verfahrens bezogen auf Orangensaft auf Seite 59 aufgeführt.

c) Bestimmung von Hesperidin und Eriodictin im Saft von Citrus medica L.

Der Zitronensaft enthält im Gegensatz zu Orangensaft mit seinem Flavanonglykosid Hesperidin und zum Grapefruitsaft mit seinem Flavanon Naringin 2 Flavanone. Es sind dies Hesperidin und Eriodictin, wobei das Hesperidin mengenmäßig weit überwiegt.

Wir führten eine Gesamtflavanonbestimmung durch und berechneten die gefundene Menge als Hesperidin, da sich die beiden Flavanone auf einfachem Weg nicht trennen lassen. Dies stellten wir bereits bei der Isolierung von Eriodictin aus Citrin (Seite 52) fest. Wir verfuhren bei der Bestimmung wie beim Orangensaft (siehe Seite 36,57,59,60 u.61 ). Auch hier setzten

wir dem Zitronensaft zuvor reines Hesperidin hinzu und kontrollierten damit die Reproduzierbarkeit der Methode (siehe Tabelle 16).

T a b e l l e 16

1. Versuch

| Zitronensaftmenge<br>Ausgangsmenge (Butanol) | 175 ml (1 Dose Sunkist Lemon Juice)<br>7 ml | |
|---|---|---|
| Davon entnommen | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.22 | 0.43 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve | 1.2 | 2.36 |
| in 7 ml Ausgangslösung bzw. in 175 ml Zitronensaft sind enthalten (in mg Hesperidin) | 42 | 41.3 |
| Bioflavonoidgehalt des Zitronensaftes | 24.0 mg % | 23.0 mg % |

2. Versuch

| Zitronensaftmenge<br>Ausgangsmenge (Butanol) | 175 ml + 20 mg Hesperidin<br>11 ml | |
|---|---|---|
| Davon entnommen | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.215 | 0.41 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve | 1.17 | 2.2 |
| Gefundene Gesamthesperidinmenge | 64 mg (36.5 mg%) | 60 mg (34.2 mg%) |
| Theoretisch | 62 mg = | 42 + 20 mg |

## IX. Anwendung der Flavanonbestimmung auf Handelsprodukte

a) Bestimmung von Naringin im Saft der "Texas"Grapefruit

2 Stück "Texas"Grapefruit wurden in üblicher Weise ausgepreßt, wobei 190 ml Preßsaft erhalten wurde.

Ausschüttelung erfolgte mit Äthylazetat. Der Rückstand wurde in 19 ml Methanol p.a. gelöst, davon 0.1; 0.2; 0.4 ml entnommen und nach Zugabe der Reagenzien die Messung in der bekannten Weise durchgeführt.

Wie aus der Tabelle 17 ersichtlich ist, liegt der Prozentgehalt des Saftes übereinstimmend bei 26 mg/%. Nach KESTERSON und HENDRICKSON[45], sowie MAURER, BURDICK und WAIBEL[46] beträgt der durchschnittliche Naringingehalt des Grapefruitsaftes zwischen 28 und 36 mg %. Diese Werte beziehen sich auf die Davismethode, die, wie auch später noch gezeigt wird, etwas zu hohe Werte liefert. Vermutlich beruht dieser hohe Prozentgehalt darauf, daß durch Natronlauge auch andere Stoffe unter Gelbfärbung mitreagieren (siehe Seite 19,20,48 u.49) und zu einer Extinktionserhöhung führen.

Tabelle 17

| Preßsaftmenge<br>Ausgangslösung | 190 ml<br>19 ml | | |
|---|---|---|---|
| Davon entnommen | 0.1 ml | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.05 | 0.12 | 0.245 |
| mg Naringin nach der Eichkurve | 0.26 | 0.56 | 1.1 |
| in 19 ml Ausgangslösung bzw. in 190 ml Saft sind enthalten (in mg Naringin) | 49 | 53 | 52 |
| Naringingehalt des Grapefruitsaftes | 25.7 mg % | 27.8 mg % | 27.3 mg % |

45) J.W.KESTERSON u. R.HENDRICKSON, Florida Expt.Sta.Bull. 511, 5 (1953)

46) R.H.MAURER, E.N.BURDICK u. C.W.WAIBEL, Lower Rio Grande Valley Citrus and Vegetable Inst.Fourth Annual Proceedings Weslaco Texas (1950)

b) Bestimmung von Naringin im Saft von "Sunkist" Grapefruit

Wir gingen von 90 ml Grapefruitsaft aus und bestimmten den Naringingehalt in bekannter Weise. Die übereinstimmend in 3 Versuchsansätzen gefundenen Prozentgehalte stimmen größenordnungsmäßig mit Literaturangaben überein[47)48)]. Für die quantitative Bestimmung des Naringins haben diese Autoren allerdings nicht nur die Davismethode, sondern auch eine gravimetrische Methode verwendet. Sie fanden einen Naringingehalt des Grapefruitpreßsaftes von 26 - 36 mg %.

Tabelle 18

| Preßsaftmenge<br>Ausgangslösung | 90 ml<br>9 ml | | |
|---|---|---|---|
| Davon entnommen | 0.1 ml | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.06 | 0.13 | 0.25 |
| mg Naringin nach Eichkurve | 0.3 | 0.6 | 1.1 |
| in 9 ml Ausgangslösung bzw. in 90 ml Saft sind enthalten (in mg Naringin) | 27 | 27 | 27 |
| Naringingehalt des Saftes | 30 mg % | 30 mg % | 30 mg % |

c) Bestimmung des Naringingehaltes von "Plymouth Grapefruit Juice"

Eine Dose "Plymouth Grapefruit Juice" enthält genau 300 ml Saft. Wir bestimmten den Naringingehalt in bekannter Weise. Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse.

Der Naringingehalt entspricht mit 24 mg % ungefähr dem Naringingehalt der von uns selbst ausgepreßten Grapefruit, den wir zu 27 - 30 mg % ermittelt hatten.

Die unterschiedlichen Prozentgehalte zwischen der "Plymouth Grapefruit" und der "Sunkist Grapefruit" können ohne weiteres damit erklärt werden, daß der Naringingehalt durch Standort und Klima Veränderungen unterliegt. "Sunkist Grapefruit" wird in Kalifornien, "Plymouth Grapefruit" in Florida gewonnen.

47) J.W.KESTERSON u. R.HENDRICKSON, Citrus Ind. 33/12, 6 (1952)
48) J.R.IRANZO, Rev.Ci.apl.(Madrid) 5, 510 (1951)

Tabelle 19

| Preßsaftmenge<br>Ausgangslösung | 300 ml<br>30 ml | |
|---|---|---|
| Davon entnommen | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.09 | 0.195 |
| mg Naringin nach Eichkurve | 0.46 | 0.93 |
| in 30 ml Ausgangslösung bzw. in 300 ml Preßsaft sind enthalten (in mg Naringin) | 69.0 | 69.0 |
| Naringingehalt des Saftes | 24 mg % | 24 mg % |

d) Bestimmung von Hesperidin im Saft von "Navel" Orangen

Wir preßten zwei "Navel" Orangen auf einer Zitronenpresse aus, erhielten 110 ml Saft und entnahmen davon 100 ml für die Bestimmung. Diesen Saft behandelten wir wie auf Seite im Experimentellen Teil beschrieben und erhielten als Ausgangslösung 15 ml. Damit führten wir die Hydrazonbildung durch. Wie aus Tabelle 20 hervorgeht, beträgt der Hesperidingehalt des Preßsaftes der "Navel" Orange 100 mg %. Umgerechnet auf Prozentgehalt pro Orange ergibt sich ein Wert von ca. 55 mg % Hesperidin, der wie zahlreiche Bestimmungen gezeigt haben, als ungefährer Mittelwert für Orangen normaler Größe angenommen werden kann.

Der Bioflavonoidgehalt von Orangenpreßsäften scheint demnach um das 3-fache höher zu liegen als bei Grapefruitsäften, ein Ergebnis, das mit Untersuchungen von HENDRICKSON und KESTERSON[49)50)] übereinstimmt. Der von den Autoren gefundene Hesperidingehalt betrug bis zu 114 mg %.

49) R.HENDRICKSON u. J.W.KESTERSON, Florida State Hort.Soc. 67, 199 (1954)
50) R.HENDRICKSON u. J.W.KESTERSON, Florida State Hort.Soc. 65, 220 (1953)

Tabelle 20

| | | |
|---|---|---|
| Preßsaftmenge | 100 ml | |
| Ausgangslösung (Butanol) | 15 ml | |
| Davon entnommen | 0.1 ml | 0.2 ml |
| Extinktion | 0.13 | 0.25 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve | 0.70 | 1.36 |
| in 15 ml Ausgangslösung bzw. in 100 ml Saft sind enthalten (in mg Hesperidin) | 105 | 102 |
| Hesperidingehalt des Saftes | 105 mg % | 102 mg % |

e) Bestimmung von Hesperidin in der Orangeade "Libella"

Nach Angaben des Herstellers von "Libella" wird diese Limonade unter Zusatz von reinem Orangensaft in den Handel gebracht.

Wir hatten 250 ml Orangeade zur Verfügung und bestimmten das Hesperidin nach der auf Seite 59 im Experimentellen Teil beschriebenen Weise und erhielten als Ausgangslösung für die Bestimmung 14 ml. Wie das Ergebnis der beiden Versuchsansätze zeigt (siehe Tabelle 21), beträgt der Hesperidingehalt nur 4 mg %. Legt man der Berechnung einen durchschnittlichen Hesperidingehalt von 50 mg % zugrunde, so würde dies heißen, daß der Orangeade etwa 1/10 Orangensaft zugefügt wurde.

Tabelle 21

| | | |
|---|---|---|
| Orangeadesaftmenge | 250 ml | |
| Ausgangslösung | 14 ml | |
| Davon entnommen | 0.4 ml | 0.6 ml |
| Extinktion | 0.06 | 0.09 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve | 0.36 | 0.52 |
| in 14 ml Ausgangslösung bzw. in 250 mg Orangeade sind enthalten (in mg Hesperidin) | 11.3 | 12.3 |
| Hesperidingehalt der Orangeade | 4.5 mg % | 4.9 mg % |

f) Bestimmung von Hesperidin und Eriodictin im "Sunkist Lemon Bioflavonoid Komplex Nr. 497*)

400 mg des Bioflavonoidkomplexes gaben wir in 150 ml Wasser und bestimmten den Hesperidin-Eriodictingehalt nach der auf Seite 61 im Experimentellen Teil beschriebenen Methode. Wir erhielten als Ausgangslösung 22 ml.

Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 22

| Bioflavonoidkomplex<br>Ausgangslösung (Butanol) | 400 mg<br>22 ml | | |
|---|---|---|---|
| Davon entnommen | 0.1 ml | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.06 | 0.125 | 0.24 |
| mg Hesperidin-Eriodictin nach der Eichkurve (als Hesperidin berechnet) | 0.36 | 0.7 | 1.3 |
| in 22 ml Ausgangslösung bzw. in 400 mg Bioflavonoidkomplex sind enthalten (in mg Hesperidin) | 79 | 77 | 71 |
| Bioflavonoidgehalt des Komplexes | 19.7 mg % | 19.2 mg % | 18.0 mg % |

Überraschenderweise liefert das Sunkistprodukt nur 20% Bioflavonoide. Obwohl genauere Angaben über den Bioflavonoidgehalt fehlen, zeigt schon die chromatographische Analyse, daß der Komplex noch eine Reihe von Stoffen enthält, die nicht zur Gruppe der Flavanone gehören.
Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit kürzlich durchgeführten Isolierungen von HOROWITZ[51)52)53)], der in der Zitrone Apigenin, Diosmin, Limocitrin und Quercetin fand. Wie aus dem Firmen-Prospekt zu entnehmen ist, wird das Präparat aus den ganzen Zitronen gewonnen.

51) R.M.HOROWITZ, J.Org.Chem. 21, 1184 (1956)
52) R.M.HOROWITZ, J.Am.chem.Soc. 79, 6561 (1957)
53) R.M.HOROWITZ, B.GENTILI, J.Am.chem.Soc. 82, 2803 (1960)

*) Hersteller: Sunkist Growers Inc.Corona, California, USA

g) Bestimmung des Hesperidin-Eriodictin-Gemisches in "Sunkist Lemon Juice"*)

Wir gingen von 175 ml Zitronenpreßsaft aus, führten die ausgearbeitete Calciumhydroxyd-Butanol-Methode durch und erhielten im Mittel 20 mg % Bioflavonoidgehalt berechnet auf Hesperidin.

Tabelle 23 zeigt das Ergebnis der beiden Versuchsansätze.

T a b e l l e 23

| Zitronensaftmenge<br>Ausgangsmenge (Butanol) | 75 ml<br>7 ml | |
|---|---|---|
| Davon entnommen | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.22 | 0.43 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve | 1.2 | 2.36 |
| in 7 ml Ausgangslösung bzw. in 175 ml Zitronensaft sind enthalten (in mg Hesperidin) | 42 | 41.3 |
| Bioflavonoidgehalt des Zitronensaftes | 20 mg % | 20 mg % |

h) Bestimmung von Hesperidin im "Hohen C" (Orangensaft)**)

Es wurden 3 verschiedene Proben "Hohes C" untersucht. Die Bestimmung erfolgte wie auf Seite 59 im Experimentellen Teil beschrieben. Tabelle 24 gibt eine Übersicht über die Versuchsansätze und das Ergebnis.

T a b e l l e 24

1. Versuch: "Hohes C" Probe a

| Saftmenge<br>Ausgangslösung (Butanol) | 200 ml<br>18 ml | |
|---|---|---|
| Davon entnommen | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.12 | 0.25 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve | 0.66 | 1.36 |
| in 18 ml Ausgangslösung bzw. in 200 ml Saft sind enthalten (in mg Hesperidin) | 59 | 61 |
| Hesperidingehalt Probe a | 29 mg % | 30 mg % |

*) Hersteller: Firma Sunkist Growers Inc.Corona, California USA
**) Hersteller: Firma Eckes, Mainz, Oktober 1959

Fortsetzung Tabelle 24

| | 2. Versuch: "Hohes C" Probe b | | 3. Versuch: "Hohes C" Probe c | |
|---|---|---|---|---|
| Saftmenge | 200 ml | | 200 ml | |
| Ausgangsmenge (Butanol) | 25 ml | | 30 ml | |
| Davon entnommen | 0.2 ml | 0.4 ml | 0.2 ml | 0.4 ml |
| Extinktion | 0.08 | 0.17 | 0.07 | 0.16 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve | 0.48 | 0.94 | 0.4 | 0.88 |
| in 200 ml sind enthalten in mg Hesperidin | 60 | 58 | 60 | 66 |
| Hesperidingehalt des "Hohen C" | 30 mg % | 29 mg % | 30 mg % | 33 mg % |

Wir stellten aus Orangen im Gewicht von 500 g Preßsäfte her und erhielten im Durchschnitt etwa 150 ml Saft. Diese 150 ml Orangenpreßsaft gewonnen aus 500 g "Navel" Orangen entsprechen einer ungefähren Hesperidinkonzentration von 150 mg %.

In 700 ml "Hohes C", gewonnen aus 2000 g Orangen, sind nach unserer Berechnung ca. 210 mg Hesperidin enthalten.

Wenngleich "Navel" Orangen über einen ausgesprochen hohen Hesperidingehalt verfügen, liegt auch unter Zugrundelegung eines mittleren Hesperidingehaltes von 50 mg%der Hesperidingehalt des "Hohen C" noch unter diesem Wert.

i) Übersicht über den Bioflavonoidgehalt der von uns untersuchten Handelsprodukte

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über den Bioflavonoidgehalt der verschiedenen Citrusfrüchte und einiger daraus gewonnenen Preßsäfte des Handels.

T a b e l l e 25

| Handelspräparat | Bioflavonoidgehalt in mg % | |
|---|---|---|
| Preßsaft einer "Texas Grapefruit" | 27 | Naringin |
| Preßsaft einer "Sunkist Grapefruit" | 30 | Naringin |
| "Plymouth Grapefruit Juice" Dose | 24 | Naringin |
| Preßsaft von "Navel" Orangen | 100 | Hesperidin |
| Orangeade "Libella" | 4 | Hesperidin |
| Bioflavonoidkomplex Nr. 497 (Sunkist) | 19 | Hesperidin-Eriodictin |
| "Sunkist Lemon Juice" Dose | 20 | Hesperidin-Eriodictin |
| "Hohes C" | 30 | Hesperidin |

Wie aus ihr hervorgeht, haben s e l b s t a u s g e p r e ß t e Orangen den höchsten Bioflavonoidgehalt in mg %. Es folgen die Preßsäfte der Grapefruit und der Zitrone, woraus ersichtlich ist, daß der Bioflavonoidgehalt der selbst hergestellten Preßsäfte höher ist als der Bioflavonoidgehalt der Handelspräparate.

## X. Vergleich unserer Methode mit der nach DAVIS[54)]

Nachdem bisher fast ausschließlich zur Bestimmung von Bioflavonoiden die DAVIS-Methode angewendet wurde (S. 19), war ein Vergleich unserer Methode mit dieser notwendig. Da die verschiedenen Fruchtsäfte außer Flavanonen auch Flavone und nicht flavonoide Stoffe enthalten, die mit Natronlauge reagieren, war von vorneherein zu erwarten, daß die Methode nach Davis zu hohe Prozentgehalte liefert.

Wir führten zum Vergleich eine Bestimmung im Orangensaft "Hohes C" durch. Wir prüften zunächst mit dem uns zur Verfügung stehendem Hesperidin die von Davis mit dem Summerson-Klett-Colorimeter aufgestellten Eichkurven. Wir benutzten das Zeiss-Spektrophotometer M 4 Q und führten die Messungen bei 358 mμ durch (S. 16).

Wie aus Tabelle 26 hervorgeht, zeigt die von uns aufgestellte Eichkurve gute Übereinstimmung mit der von DAVIS[54)].

Tabelle 26

| Hesperidin (mg) | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.3 |
|---|---|---|---|---|
| Extinktion M 4 Q | 0.06 | 0.12 | 0.24 | 0.36 |
| Extinktion DAVIS | 30 | 60 | 120 | 180 |

Wir entnahmen dem "Hohen C" 0.2 ml und fügten 10 ml Äthylenglycol und 0.2 ml 4 n Natronlauge hinzu. Wie die Tabelle 27 zeigt, lagen die Werte von Davis wie erwartet höher als die von uns nach der Hydrazonmethode ermittelten. Durchschnittlich erhält man nach der Davis-Methode 15% mehr Hesperidin.

Tabelle 27

| Charge | a | b | c |
|---|---|---|---|
| Extinktion | 0.084 | 0.09 | 0.09 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve | 0.07 | 0.075 | 0.075 |
| Gesamtmenge nach DAVIS | 35 mg % | 38 mg % | 38 mg % |
| Gesamtmenge nach unserer Methode | 30 mg % | 29 mg % | 30 mg % |

54) W.B.DAVIS, Analytic.Chem. 19, 476 (1947)

Da nach den letzten Arbeiten von HOROWITZ[55] speziell in den Zitronen noch eine Reihe neuer bisher unbekannt gebliebener Flavone enthalten sind, die bei der Davis-Bestimmung zwangsläufig mitbestimmt werden, wurde auch der Lemon Bioflavonoid Komplex Nr. 497 von Sunkist nach der Davis-Methode auf den Bioflavonoidgehalt hin untersucht (Untersuchung nach unserer Methode siehe Seite 44).

Tabelle 28

| | |
|---|---|
| Bioflavonoidkomplex | 1 mg |
| Extinktion | 0.35 |
| mg Hesperidin nach Eichkurve (Seite 48) | 29 |
| Bioflavonoidgehalt nach DAVIS | 29 mg % |
| Bioflavonoidgehalt nach unserer Methode | 19 mg % |

Wie aus Tabelle 28 ersichtlich, ermittelten wir mit der Davis-Methode für den Lemon Bioflavonoid Komplex Nr. 497 einen Bioflavonoidgehalt von 29 mg %, während wir mit unserer Methode einen Gehalt von 19 mg % erhielten.

Wie besonders dieses Beispiel zeigt, ist die Davis-Methode keine exakte Bestimmungsmethode, die für Zwecke der Standardisierung benutzt werden kann, da die Methode eine Reihe von Fehlerquellen unberücksichtigt läßt. Die Davis-Methode hat außerdem den Nachteil, daß sie von verdünnten Lösungen ausgeht, wodurch naturgemäß die Fehlergrenze breiter wird.

Dieser Fehler wird bei unserer Methode dadurch umgangen, daß der Preßsaft vorbehandelt und stark konzentriert wird.

Nach neueren Untersuchungen von HENDRICKSON, KESTERSON und EDWARDS[56] ist außerdem die Davis-Methode bei reifen und überreifen "Grapefruit"-Früchten nicht anwendbar.

---

55) R.M.HOROWITZ, J.Org.Chem. 21, 1184 (1956), J.Amer.chem.Soc. 82, 2803 (1960)

56) R.HENDRICKSON, I.W.KESTERSON u. G.I.EDWARDS, Florida State Hort Soc. 71, 194 (1958)

# D. EXPERIMENTELLER TEIL

## I. Isolierung der Citrusbioflavonoide

Zur Aufstellung der Eichkurven und für andere analytische Untersuchungen wurden die in Frage kommenden Verbindungen selbst isoliert.

a) Isolierung von Hesperidin (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxy-flavanon-7-rhamnoglucosid)

Infolge der Unlöslichkeit des Hesperidins in fast allen üblichen Lösungsmitteln erfolgt die Darstellung immer durch eine Extraktion im alkalischen Milieu, da sich in diesem Falle das Hesperidinmolekül zum Chalkon aufspaltet und dann sowohl in Wasser als auch in Alkohol löslich ist.

Wir stellten Hesperidin nach einer Methode, die im Handbuch der Pflanzenanalyse von KLEIN[57] beschrieben ist, her.

500 g getrocknete unreife Orangenschalen pulverten wir grob, extrahierten solange mit kaltem Wasser bis in den wässrigen Auszügen durch Bleiazetat keine Fällung mehr hervorgerufen wurde. Dann extrahierten wir mit einer Mischung aus 250 ml Wasser und 250 ml Alkohol, der noch 4 g Natrium hydricum zugesetzt wurde, weiter. Sobald sich die verdünnte alkoholische Natronlauge nicht mehr färbte, beendeten wir die Extraktion. Günstiger ist es, die stark aufgequollene Masse wiederholt durch scharfes Abpressen von der aufgesogenen Lösung zu befreien. Das aus den alkoholischen Auszügen durch verdünnte Salzsäure gefällte rohe Hesperidin wurde zur Entfernung von färbenden Verunreinigungen mit 100 ml Alkohol ausgekocht und die fast farblose Masse bei gewöhnlicher Temperatur in stark verdünnter Alkalilauge, der man kleine Mengen Alkohol zugesetzt hatte, gelöst. Aus dieser Lösung fällten wir das Hesperidin durch Einleiten eines sehr langsamen Kohlendioxydstroms wieder aus. Der gut ausgewaschene Niederschlag bestand aus reinem Hesperidin.

---

57) G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse" Bd. 3,2,887, Verlag J.Springer, Wien (1932)

Ausbeute: 4.0 g Schmelzpunkt: 260°C (Kofler corr.)

Hesperidin $C_{28}H_{34}O_{15}$ + 1 1/2 $H_2O$ (610)

| | | |
|---|---|---|
| ber.: | 55.02 % C | 5.58 % H |
| gef.: | 54.57 % C | 6.08 % H |

b) Isolierung von Naringin (5,4'-Dihydroxyflavanon-7-rhamnoglucosid)

ASAHINA und INUBUSE[58] extrahierten die getrockneten Blüten von Citrus decumana L. zweimal mit heißem Alkohol, dampften die Lösung ein und nahmen den Rückstand in siedendem Wasser auf. Dann versetzten sie die trübe Flüssigkeit mit etwas Aluminiumazetatlösung und filtrierten sie nach starkem Schütteln heiß ab. Beim Stehen setzte sich das Naringin aus dem klaren, gelblichen Filtrat als flockiger Niederschlag aus. Durch Sättigung mit Chloroform oder besser mit Äther wurde sein Absetzen beschleunigt. Sie filtrierten den Niederschlag nach etwa 2 Tagen ab und kristallisierten aus 60%igem Alkohol um.

Eine andere Methode zur Gewinnung von Naringin aus der Grapefruit führte BAIER[59] und HIGBY[60] durch.

Wir führten die Isolierung nach einer Angabe von ZOLLER[61] durch.

500 g getrocknete Schalen von Citrus decumana L. extrahierten wir im Soxhlet mit 95%igem Alkohol. Den Extrakt engten wir bei 10 mm Druck und einer 80°C nicht übersteigenden Temperatur ein und nahmen den zurückbleibenden Sirup in Wasser auf. Durch Zusatz von 10 ml einer 25%igen Lösung aus basischem Bleiazetat fällten wir die außer Naringin vorhandenen Stoffe aus, dann filtrierten wir ohne zu saugen ab und fällten das überschüssige Blei aus der heißen Lösung mit Schwefelwasserstoff aus. Bei mehrstündigem Stehenlassen scheidet sich das Naringin aus dem Filtrat ab.

---

58) Y.ASAHINA u. M.INUBUSE, Ber.dtsch.chem.Ges. 61, 1514 (1928)
59) W.E.BAIER, U.S.Patent 2 421 063, 27.5.1947
60) R.H.HIGBY, U.S.Patent 2 421 062, 27.5.1947
61) H.F.ZOLLER, Ind.Engng.Chem. 10, 364 (1918)

Dieses kristallisierten wir mehrmals aus 60%igem Alkohol um.

Ausbeute: ca. 2.0 g Schmelzpunkt: 170-171°C (Kofler corr.)

Naringin $C_{27}H_{32}O_{14} + 2\ H_2O$ (580)

| | | |
|---|---|---|
| ber.: | 55.58 % C | 5.51 % H |
| gef.: | 55.04 % C | 5.90 % H |

c) Isolierung von Eriodictyol (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon)

Zur Isolierung des Eriodictyols verwendeten wir Zitronenschalen und gewannen daraus Citrin[62], das eine Mischung von Hesperidin und Eriodictin ist. Wir fällten die Flavanone in saurer Lösung durch Blei, um sie dann als Natrium oder Kaliumphenolat aus wasserarmer alkoholischer Lösung mit Natron- oder Kalilauge zu fällen. Wir erhielten wohl Citrin, aber eine Abtrennung des Eriodictins gelang nicht. Wir erhielten kein schmelzpunktreines Produkt. Deshalb versuchten wir Eriodictyol durch Demthylierung aus Hesperetin zu erhalten. Dabei erprobten wir 3 verschiedene Methoden, von denen schließlich die Dritte zum Erfolg führte.

1.) 100 mg Hesperetin versetzten wir mit 6 ml Salzsäure (d=1.7) und 1.5 g Phenol. Diese Mischung erhitzten wir 4 Stunden lang auf dem Paraffinbad bei 160°C. Dann fällten wir durch Zugabe von Wasser das Rohprodukt. Das Endprodukt zeigte auch nach mehrmaligem Umkristallisieren mit wässrigem Alkohol keinen genauen Schmelzpunkt.

2.) Eine Lösung von 250 mg Hesperetin erhitzten wir in 50 ml Bromwasserstoff (48%) und 18.5 ml Essigsäure 1 Stunde lang gelinde am Rückflußkühler. Dann wurde abgekühlt und im Überschuß verdünnte Schwefelsäure hinzugegeben. Auch hier erhielten wir kein reines Eriodictyol.

---

62) A.SZENT-GYÖRGYI, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chemie 255, 126 (1938)

3.) 100 mg Hesperetin wurden am Rückflußkühler 2 Stunden lang mit 3 ml Jodwasserstoff auf einem Paraffinbad unter Zusatz von 1.5 ml Phenol und 0.5 ml Essigsäureanhydrid im Kohlendioxydstrom bei 150°C Badtemperatur erhitzt. Anschließend fällten wir mit Wasser und kristallisierten aus wässrigem Alkohol (2:1) mehrmals um.

Ausbeute: ca. 10 mg Schmelzpunkt: 261°C (Kofler corr.)

Eriodictyol $C_{15}H_{12}O_6$ + 2 1/2 $H_2O$ (288)

d) Isolierung von Homoeriodictyol (5,7,4'-Trihydroxy-3'-methoxyflavanon)

Nachdem die Isolierung von Homoeriodictyol mit Methanol nach einer Vorschrift, die im Handbuch der Pflanzenanlyse von KLEIN[63] angegeben ist, nicht gelang, führten wir die Isolierung wie folgt durch.

300 g Folia Eriodictyon californium L. wurden im Starmix pulverisiert und im Soxhlet mit 300 ml Äther extrahiert. Wir erhielten eine dunkelbraune Ätherlösung. Diese Lösung filtrierten wir durch Wattescheibchen und schüttelten mit 50 ml einer 10%igen Ammoniumcarbonatlösung gut durch, dekantierten von der teerigen Masse ab und schüttelten mit 200 ml 10%iger kalter Natriumcarbonatlösung durch. Wir erhielten einen dicken, gelblichen Niederschlag. Das Filtrat ließen wir in verdünnte Salzsäure tropfen, nahmen es wiederum auf und schüttelten mit 10%iger kalter Natriumcarbonatlösung gut durch. Die verschiedenen Fraktionen des Natriumsalzes wurden vereinigt und aus Wasser umkristallisiert. Dann gaben wir die bräunlichen Nadeln in 100 ml heißen Eisessig und erhielten nach mehrmaligem Umkristallisieren glänzende nahezu farblose Nadeln, die zwischen 222 und 224°C auf der Koflerheizbank schmolzen.

Ausbeute: 200 mg Schmelzpunkt 222 - 224°C (Kofler corr.)

Homoeriodictyol $C_{16}H_{14}O_6$ (302)

| | | |
|---|---|---|
| ber.: | 63.57 % C | 4.63 % H |
| gef.: | 62.70 % C | 4.78 % H |

63) G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse" Bd.3,2, 889, Verlag J.Springer, Wien (1932)

## II. Hydrolyse und Methylierung

### a) Hydrolyse von Hesperidin

Ein Hydrolyseversuch von Hesperidin mit Schwefelsäure nach der Vorschrift von KLEIN[64] war erfolglos. Ein gutes Ergebnis hingegen brachte eine Hydrolyse mit Äthylenglycolzusatz nach folgender Vorschrift.

3.0 g Hesperidin versetzten wir mit 50 ml Äthylenglycol "Merck" und 10 ml 30%iger Schwefelsäure p.a., erhitzten 6 Stunden lang im Wasserbad und ließen über Nacht im Eisschrank stehen. Dann fällten wir das Hesperetin mit Wasser aus, lösten es nach gründlichem Auswaschen in Alkohol und versetzten die Lösung zur Entfernung färbender Verunreinigungen mit 5 ml Bleiazetatlösung. Nach dem Abfiltrieren des Bleiniederschlages gaben wir bis zur deutlich sauren Reaktion Essigsäure hinzu und fällten aus der erwärmten Lösung durch allmählichen Zusatz von heißem Wasser die reine Verbindung aus. Nach nochmaligem Umkristallisieren erhielten wir reines Hesperetin.

Ausbeute: ca. 2 g Schmelzpunkt: 227°C (Kofler corr.)

Hesperetin $C_{16}H_{14}O_6$ + 1 $H_2O$ (302)

### b) Hydrolyse von Naringin

Bei der Hydrolyse von Naringin ist die Methode mit Salzsäure der mit Schwefelsäure vorzuziehen.

100 mg Naringin lösten wir in 1 ml Methanol p.a., gaben dazu 1 ml 25%ige Salzsäure und 8 ml Aqua destillata. Dann erhitzten wir etwa 3 Stunden auf dem Wasserbad mit Rückflukühler. Zum Schluß dampften wir den Methylalkohol ab und schüttelten mit Äther aus.

Ausbeute: ca. 40 mg Schmelzpunkt: 248°C (Kofler corr.)

Naringenin $C_{15}H_{12}O_5$ (272)

---

64) G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse" Bd. 3,2,887, Verlag J.Springer, Wien (1932)

c) Methylierung von Hesperetin

Um für die analytischen Untersuchungen der Flavanone auch eine Substanz ohne freie OH-Gruppe am C-5 zur Verfügung zu haben, führten wir eine Totalmethylierung von Hesperetin nach folgender Vorschrift durch.

100 mg Hesperetin wurden im Trockenschrank bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. 50 mg der getrockneten Substanz wurden in 75 ml Azeton p.a. gelöst und mit 2 g wasserfreiem Kaliumcarbonat und 0.75 ml Dimethylsulfat 1 Stunde geschüttelt. Danach hielt man das Reaktionsgemisch für 30 Stunden unter Rückfluß auf dem Heizpilz in schwachem Sieden. Zur Vermeidung von Wasserzutritt wurde der Rückflußkühler mit einem Calciumchloridrohr versehen. Die Azetonlösung wurde darauf filtriert und der Kolben 2 mal mit 10 ml Azeton nachgewaschen. Man fügte 10 ml Aqua destillata hinzu, ließ das Azeton auf dem Wasserbad vorsichtig abdunsten und stellte die wässrige Lösung über Nacht in den Eisschrank. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde in ca. 10 ml Methanol 50%ig auf dem Wasserbad gelöst, heiß filtriert und die Lösung für 2 Tage in den Eisschrank gestellt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und im Vakuum bei ca. 50°C getrocknet.

Ausbeute: 16 mg Schmelzpunkt: 116°C (Kofler corr.)

5,7,3',4'-methoxyflavanon $C_{19}H_{20}O_6$ (344)

ber.: $OCH_3$ 36.04 %
gef.: $OCH_3$ 31.0 %

## III. Darstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Hesperidin, Hesperetin, Naringin, Naringenin und Homoeriodictyol

1.0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin "Merck" wird in 2 ml Schwefelsäure p.a. d=1.84 gelöst und mit Methanol p.a. auf 100 ml aufgefüllt.

Zu 1 ml dieser Reagenzlösung gaben wir 10 - 20 mg Flavanon hinzu und erhitzten die Mischung etwa 50 Minuten lang auf dem Wasserbad bei 50 - 55°C. Nach dem Erkalten fiel das Dinitrophenylhydrazon aus. Wir filtrierten durch einen Glasfilter G 3, lösten den Rückstand in ganz wenig heißem Dioxan und fügten dieser Lösung einige Tropfen Wasser hinzu. Nun ließen wir über Nacht im Eisschrank stehen und filtrierten dann wieder ab. Den Rückstand wuschen wir mit kaltem Äther und trockneten anschließend bei 100°C etwa 2 Stunden lang.

### Chromatographie der 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Flavanone

Zur Chromatographie verwendeten wir die absteigende Methode und Papier Nr. 2043 b Gl (Schleicher u. Schüll). Als Lösungsmittel kam ein Dioxan-Eisessig-Wasser-Gemisch (5:3:2) zur Verwendung. Laufzeit 8 - 12 Std.

### Anfärbereagenzien

Als ein gutes Anfärbereagenz erwies sich 10%ige alkoholische Kalilauge. Während alle Flecke blauviolett angefärbt wurden, ergab reines 2,4-Dinitrophenylhydrazin eine gelbbraune Farbe.

Als ein zweites sehr brauchbares Sprühreagenz erwies sich eine alkoholische Natriumäthoxylösung, die man durch Auflösen von 0.3 g metallischem Natrium in 100 ml Äthanol erhält.

## IV. Aufstellung von 2,4-DNPH-Flavanon-Eichkurven mit dem Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q

Reagenzien:

1.0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin "Merck"
2 ml Schwefelsäure p.a. d=1.84
ad 100 ml Methanol p.a.

10.0 g Kalium hydricum puriss. in rot,
30 ml Aqua destillata
ad 100 ml Methanol p.a.

1%ige methanolische Lösung von Hesperetin, Naringin, Naringenin und Homoeriodictyol
1%ige alkalische, methanolische Lösung von Hesperidin.

In eine Bürette gibt man die 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung, in eine andere die 10%ige alkoholische Kalilauge. Eine dritte Bürette ist mit Methanol p.a. gefüllt.

Dann werden in 6 Reagenzgläser je 1 ml der 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung gegeben. Zu 5 dieser Reagenzgläser fügten wir 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ml einer Flavanonlösung (= 1, 2, 3, 4, 5 mg) hinzu und erhitzten anschließend 50 Minuten im Wasserbad bei 50 - 55°C. Ein Thermostat ist nicht erforderlich.

Nach dem Erkalten wird zuerst 1 ml der 10%ige alkoholischen Kalilauge zugegeben und stark geschüttelt. Die Lösung wird in wenigen Sekunden tief rot. Dann läßt man noch 3 ml 10%iger Kalilauge hinzufließen und schüttelt gut durch.

Die nun folgende Messung im Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q wird s o f o r t vorgenommen. Den Lösungen werden je 0.1 ml entnommen, in eine Glasküvette gegeben und aus der Methanolbürette auf 3.5 ml aufgefüllt. Nach gutem Durchmischen wird gegen die reine 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung + Kalilauge gemessen, und zwar die Aglykone bei 480 mμ und die Glykoside bei 470 mμ.

## V. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Naringin im Saft der Grapefruit

Reagenzien:

2,4-Dinitrophenylhydrazin "Merck"
Schwefelsäure p.a. D=1.835
Methanol p.a.
Kalium hydricum puriss. in rot.
Äthylazetat
Äther
Natrium sulfuricum sicc.

1.0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin "Merck" wird in 2 ml conc. Schwefelsäure gelöst und mit Methanol p.a. auf 100 ml aufgefüllt.

10.0 g Kalium hydricum puriss. werden in 30 ml Aqua destillata gelöst und mit Methanol p.a. auf 100 ml aufgefüllt.

Auf einer gewöhnlichen Zitronenpresse mit Sieb wird eine Grapefruit mit der Hand ausgepreßt, der erhaltene Saft (ca. 50 - 100 ml) in einem 1 ml graduierten Meßkolben auf 1 ml genau abgemessen und mit 3 mal 100 ml Äther ausgeschüttelt. Dabei ist darauf zu achten, daß wegen der leicht eintretenden Emulsion nicht zu kräftig geschüttelt wird. Die wässrige Phase einschließlich der Emulsionsphase der letzten Ausschüttelung werden mit 10 mal 50 ml Äthylazetat ausgeschüttelt.

Die so erhaltene Äthylazetatphase versetzt man im Schütteltrichter mit etwa 100 g Natrium sulfuricum sicc., läßt 1/2 Stunde stehen, filtriert durch ein trockenes Filter in einen trockenen Rundkolben von 1000 ml, dampft auf dem Dampfbad bis zur Trockene ein und löst den Rückstand in 1/10 der Saftmenge Methanol p.a.

In 3 Reagenzgläser werden jeweils 1 ml der 2,4-DNPH-Lösung gegeben.

In ein Reagenzglas gibt man 0.2 ml unserer methanolischen Lösung, in das andere 0.4 ml. Das dritte dient als Blindprobe. Anschließend kommen die 3 Lösungen 50 Minuten lang in ein Wasserbad von 50 - 55°C. Nach dem Erkalten werden je 4 ml der 10%igen alkoholischen Kalilauge in der Weise zugegeben, daß zuerst 1 ml und dann nach gutem Umschütteln die restlichen 3 ml hinzugefügt werden. Von diesen Lösungen gibt man nun sofort jeweils 0.1 ml in eine Glasküvette und füllt mit Methanol p.a. auf 3.5 ml auf. Nach dem Umschütteln wird im Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q gegen die Blindprobe von DNPH bei einer Wellenlänge von 470 mμ die Extinktion gemessen.

Glykosidgehalt des Grapefruitsaftes in Prozent (g/100 ml) bei Zugabe von

0.2 ml = 0.245 x E
0.4 ml = 0.125 x E

## VI. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Hesperidin im Saft der Orange

Reagenzien:

2,4-Dinitrophenylhydrazin "Merck"
Schwefelsäure p.a. D=1.835
Methanol p.a.
Kalium hydricum puriss. in rot.
Äther
Calcium oxydatum
Salzsäure p.a. 25%ig
Butanol p.a.

1.0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin "Merck" wird in 2 ml conc. Schwefelsäure gelöst und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.

10.0 g Kalium hydricum puriss. werden in 30 ml Aqua destillata gelöst und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.

20.0 g Calcium oxydatum werden mit 80.0 g Aqua destillata versetzt.

Auf einer gewöhnlichen Zitronenpresse mit Sieb werden 3 Orangen mit der Hand ausgepreßt und von der Gesamtsaftmenge (100 - 150 ml) nach gutem Durchschütteln genau 100 ml abgemessen.

Diese 100 ml schütteln wir mit 5 mal 100 ml Äther aus. Dabei ist zu beachten, daß nur leicht ausgeschüttelt wird. Am Ende der Ausschüttelung haben wir drei Phasen. 1. die Ätherphase, 2. eine Emulsionsphase und 3. eine wässrige Phase. Die letzten zwei Phasen verdünnen wir mit 100 ml Aqua destillata und schütteln sie mit 3o ml der Calciumhydroxyaufschlämmung etwa 10 Minuten lang gut durch.

Nach 1/2 Stunde geben wir die Aufschlämmung auf eine Nutsche, die mit normalen Filtrierpapier ausgelegt ist und waschen den Rückstand mit ca. 100 - 200 ml einer 0.17%igen Calciumhydroxydlösung nach. Das Filtrat ist bei allen Orangen außer Blutorangen klar dunkelgelb bei einem pH von 9 - 11. Bei Blutorangen ist das Filtrat klar grünlichgelb gefärbt.

Dann wird solange 25%ige Salzsäure hinzugefügt, bis sich die klare, dunkelgelbe Lösung grün und die klar, grüngelbe Lösung bei Blutorangen rot färben. Dazu sind durchschnittlich 3 - 5 ml Salzsäure 25%ig erforderlich. der pH-Wert dieser Lösung liegt bei etwa 3.

Diese wässrige Lösung schüttelten wir mit 3 mal 100 ml Butanol vorsichtig aus. Dabei kann am Anfang eine Emulsion auftreten, die durch eine nach einigen Minuten erfolgte zweite Zugabe von Butanol wieder verschwindet. Bei der Butanolausschüttelung ist wie bei der Ätherausschüttelung darauf zu achten, daß sehr vorsichtig ausgeschüttelt wird.

Diese Butanolphase wird nun auf dem Dampfbad im Vakuum bis auf mindestens 10 ml abgedampft. Wir messen den Butanolrückstand in einem Meßkolben genau ab.

Die DNPH-Bildung wird sofort durchgeführt.
In drei Reagenzgläser werden jeweils 1 ml der 2,4-DNPH-Lösung gegeben. In ein Reagenzglas gibt man 0.2 ml unserer Butanollösung, in das andere 0.4 ml. Das dritte dient als Blindprobe.

Anschließend kommen die drei Lösungen 50 Minuten lang in ein Wasserbad von 50 - 55°C. Nach dem Erkalten werden je 4 ml der 10%igen alkoholischen Kalilauge in der Weise hinzugefügt, daß zuerst 1 ml und dann nach gutem Umschütteln die restlichen 3 ml hinzugefügt werden. Von diesen Lösungen gibt man nun sofort jeweils 0.1 ml in eine Glasküvette und füllt mit Methanol auf 3.5 ml auf. Nach dem Umschütteln wird im Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Q gegen die Blindprobe von DNPH bei einer Wellenlänge von 470 mμ die Extinktion gemessen.

Glykosidgehalt des Orangensaftes in Prozent (g/100 ml) bei Zugabe von

$$0.2 \text{ ml (an Butanollösung)} = 2.7 \times \frac{\text{Butanolrückstand in ml}}{\text{Gesamtsaftmenge in ml}}$$

$$0.4 \text{ ml ( an Butanollösung)} = 1.35 \times \frac{\text{Butanolrückstand in ml}}{\text{Gesamtsaftmenge in ml}}$$

## VII. Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines Hesperidin-Eriodictin-Gemisches (als Hesperidin berechnet) im Saft einer Zitrone

Reagenzien:

2,4-Dinitrophenylhydrazin "Merck"
Schwefelsäure p.a. D=1.835
Methanol p.a.
Kalium hydricum puriss. in rot.
Äther
Calcium oxydatum
Salzsäure p.a. 25%ig
Butanol p.a.

1.0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin "Merck" wird in 2 ml conc. Schwefelsäure gelöst und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.

10.0 g Kalium hydricum puriss. werden in 30 ml Aqua destillata gelöst und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.

20.0 g Calcium oxydatum werden mit 80.0 g Aqua destillata versetzt.

Die Gesamtflavanonbestimmung erfolgt nach derselben Vorschrift wie bei der Orange angegeben (siehe Seite 59 u. 60).

Glykosidgehalt des Zitronensaftes in Prozent (g/100 ml) bei Zugabe von

$$0.2 \text{ ml (an Butanollösung)} = 2.7 \times \frac{\text{Butanolrückstand in ml}}{\text{Gesamtsaftmenge in ml}}$$

$$0.4 \text{ ml (an Butanollösung)} = 1.35 \times \frac{\text{Butanolrückstand in ml}}{\text{Gesamtsaftmenge in ml}}$$

## VIII. Anwendung der Flavanonbestimmung auf Handelsprodukte

a) Bestimmung von Naringin im Saft der "Texas" Grapefruit (S.40)

Die quantitative Bestimmung des Naringins erfolgte wie auf Seite 58 beschrieben. Durch Auspressen der Grapefruit erhielten wir 190 ml Saft. Mit 0.1, 0.2 und 0.4 ml der methanolischen Lösung von 19 ml führten wir die spektrophotometrische Messung nach der DNPH-Kupplung durch. Es wurden Extinktionen von 0.05, 0.12 und 0.245 gemessen, die einer Naringinmenge von 0.26, 0.56 und 1.1 mg entsprachen. Der Naringingehalt des Grapefruitsaftes errechnet sich demnach zu 26, 27 und 27 mg %.

b) Bestimmung von Naringin im Saft einer "Sunkist" Grapefruit (S.41)

Die Bestimmung wurde, wie auf Seite 58 beschrieben, durchgeführt. Durch Auspressen erhielten wir eine Saftmenge von 90 ml. Der Naringingehalt dieses Grapefruitsaftes betrug 30 mg %.

c) Bestimmung des Naringingehaltes einer Dose "Plymouth" Grapefruit Juice (S.41)

Die Bestimmung erfolgte wie auf Seite 58 beschrieben. Diesmal hatten wir bereits den Grapefruitsaft zur Verfügung. 300 ml Saft ergaben nach Behandlung 30 ml methanolische Lösung. Mit 0.2 und 0.4 ml dieser methanolischen Lösung führten wir die spektrophotometrische Messung nach der DNPH-Kupplung durch. Es wurden Extinktionen von 0.09 und 0.195

gemessen, was einer Naringinmenge von 0.46 und 0.93 mg entsprach. Der Naringingehalt der Dose Grapefruitsaft betrug 24 mg %.

d) Bestimmung von Hesperidin im Saft von "Navel" Orangen (S.42)

Die Bestimmung des Hesperidins erfolgte wie auf Seite 59 angegeben. Von dem Preßsaft entnahmen wir 100 ml. Nach Behandlung dieses Saftes hatten wir 15 ml Butanollösung zur Verfügung. Mit 0.1 und 0.2 ml dieser Butanollösung führten wir die spektrophotometrische Messung nach der DNPH-Kupplung durch. Es wurden Extinktionen von 0.13 und 0.25 gemessen, was einer Hesperidinmenge von 0.7 und 1.36 mg entsprach. Der Hesperidingehalt des Orangenpreßsaftes betrug 100 mg %.

e) Bestimmung von Hesperidin in der Orangeade "Libella" (S.43)

Hier wurde von vorneherein ein sehr niederer Hesperidingehalt angenommen, daher war das Verhältnis Saftmenge zu Ausgangslösung größer als bei den anderen Hesperidinbestimmungen. Die Bestimmung erfolgte wie auf Seite 59 angegeben. Aus 250 ml Orangeade erhielten wir nach Vorbehandlung 14 ml Butanollösung. Davon entnahmen wir 0.4 und 0.6 ml und führten die spektrophotometrische Messung nach der DNPH-Kupplung durch. Es wurden Extinktionen von 0.06 und 0.09 gemessen, was einer Hesperidinmenge von 0.36 und 0.52 mg entsprach. Somit betrug der Hesperidingehalt der Orangeade 4 mg %.

f) Bestimmung von Hesperidin und Eriodictin im "Sunkist Lemon" Bioflavonoid Komplex Nr. 497 (S.44)

Laut Chromatogramm waren in diesem Komplex noch andere nicht flavanonartige Substanzen vorhanden. Die Durchführung der Bestimmung erfolgte wie auf Seite 61 angegeben. Wir gingen von 400 mg Substanz aus. Nach Behandlung des Komplexes hatten wir 22 ml Butanollösung zur Verfügung. Mit 0.1, 0.2 und 0.4 ml stellten wir Extinktionen von 0.06, 0.125 und 0.24 fest. Diese entsprachen einem Gesamtflavanongehalt von 0.36, 0.70 und 1.3 mg. Berrechnet wurde alles als Hesperidin. Somit hatte der Lemon Bioflavonoid Komplex Nr. 497 einen Bioflavonoidgehalt von 19.7, 19.2 und 18.0 mg %.

g) Bestimmung des Hesperidin-Eriodictin-Gemisches einer Dose "Sunkist Lemon Juice" (S.45)

Die Bestimmung erfolgte wie auf Seite 61 beschrieben. Berechnet wurde der Gesamtbioflavonoidgehalt als Hesperidin. Wir hatten 175 ml Zitronensaft zur Verfügung, der nach Vorbehandlung 7 ml Butanollösung ergab. 0.2 und 0.4 ml ergaben Extinktionen von 0.22 und 0.43, was einer Bioflavonoidmenge von 1.2 und 2.36 mg entsprach. Somit hatte der Zitronensaft einen Bioflavonoidgehalt von 20 mg %.

h) Bestimmung von Hesperidin im "Hohen C" Orangensaft (S.45)

Die Bestimmung des Hesperidins erfolgte wie auf Seite 59 angegeben. Wir untersuchten 3 Chargen "Hohes C" und stellten einen Bioflavonoidgehalt von 29 - 30 mg % fest.

## E. ANHANG

### I. Geschichte und Vorkommen von Hesperidin, Naringin, Homoeriodictyol und Eriodictin

#### a) Hesperidin

Hesperidin wurde 1828 zum ersten Mal von LEBRETON[65] aus unreifen Orangen und Pomeranzen isoliert. Von ihm stammt auch der Name. 1874 fand PFEFFER[66] in fast allen Teilen und Blattorganen der Apfelsine Hesperidin. Zwei Jahre später gelang HOFFMANN[67] zum ersten Male eine Hydrolyse des Hesperidins. Diese neue Substanz nannte er Hesperetin, konnte aber den Zuckerrest noch nicht eindeutig identifizieren. Erst WILL[68] fand 1887 bei der Spaltung neben Glucose noch Rhamnose. Ende der zwanziger Jahre befaßten sich mehrere Forschergruppen mit der genauen Strukturaufklärung.

So bewies 1931 KING[69], daß die Biose am C-7 Atom verknüpft war, nachdem zwei Jahre früher die Japaner ASAHINA und INUBUSE[70] die Bruttoformel aufgestellt hatten.

Erst durch SZENT-GYÖRGYI[71] wurde Hesperidin in weitesten Kreisen bekannt. Er erkannte als erster im Jahre 1936 die physiologische Wirkung dieser Substanz .

Hesperidin kommt in den Früchten verschiedener Citrusarten vor. Viele Angaben über das Vorkommen von Hesperidin beziehen sich aber meistens auf andere hesperidin-ähnliche Verbindungen.

#### b) Homoeriodictyol

MOSSLER[72] stellte 1907 das sogenannte "Eriodictyonon" aus "Yerba santa" (Eriodictyon glutinosum Benth.) her und

---

65) L.LEBRETON, J.Pharmac.Chim. 14, 377 (1828)
66) F.PFEFFER, Bot.Ztg. 32, 529 (1874)
67) E.HOFFMANN, Chem.Ber. 9, 685 (1876)
68) W.WILL, Chem.Ber. 20, 1186 (1887)
69) F.E.KING, J.chem.Soc.(London) 139, 1704 (1931)
70) Y.ASAHINA u. M.INUBUSE, ref. C.A.I. 2429 (1929)
71) A.SZENT-GYÖRGYI, Dtsch.med.Wschr. 62, 1325 (1936), Nature 138, 27, 798 (1936)
72) G.MOSSLER, Liebigs Ann.Chem. 351, 233 (1907)

klärte die Konstitution auf, die dann von POWER und TUTIN[73] bestätigt wurde. Im Jahre 1929 befaßte sich SHINODA[74] mit der Struktur von Homoeriodictyol und führte die Synthese durch.

c) Naringin

Erstmals isolierte DE VRY 1857 aus den Blüten von Citrus decumana L. eine Verbindung, die er identisch mit Hesperidin glaubte, aber von HOFFMANN[75] 1876 als eine andere flavonoide Substanz erkannt und als Naringin bezeichnet wurde.

Eine Darstellung des Aglykons führte WILL[76] 1885 durch. Er nannte die neue Substanz Naringenin und identifizierte gleichzeitig als Zuckerkomponente Rhamnose und Glucose. 1929 klärte ASAHINA[77] die Konstitution auf.

d) Eriodictin

Eriodictin wurde 1942 von MAGER[78] als Eriodictyol-L-Rhamnosid aufgeklärt, nachdem bereits SZENT-GYÖRGYI[79] im Jahre 1936 den glykosidischen Charakter der Verbindung als Bestandteil des Citrins festgestellt hatte.

Viel früher als das Glykosid isolierten POWER und TUTIN[73] das Aglykon Eriodictyol aus den Blättern von Eriodictyon californium Greene. Von ihnen stammt auch der Name. Den Japanern SHINODA und SATO[80] gelang dann 1930 die Synthese von Eriodictyol.

---

73) F.B.POWER u. F.TUTIN, Soc. 91, 887 (1907)
74) J.SHINODA, J.Pharmac.Soc. Japan 49, 7 (1929)
75) E.HOFFMANN, Arch.Pharmaz. 214, 139 (1879)
76) W.WILL, Chem.Ber. 18, 1311 (1885)
77) Y.ASAHINA, ref. C.A.I. 2429 (1929)
78) A.MAGER, Ger.Patent, 723, 225 Juni 18 (1942)
79) A.SZENT-GYÖRGYI, Nature 138, 27, 798 (1936)
80) J.SHINODA u. S.SATO, J.Pharmac.Soc. Japan 50, 65 (1930)

## II. Infrarotspektren der Citrusbioflavonoide

### a) Frequenz der Carbonylbande

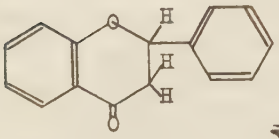
Die Valenzschwingung der Carbonylbande wird als scharfe Bande im Bereich von 1830 - 1600 $cm^{-1}$ sichtbar. Die genaue Lage der Bande innerhalb des genannten Bereiches ist in der Hauptsache vom Grad der Konjugation abhängig und kann durch die jeweiligen Resonanzverhältnisse im Molekül modifiziert sein. Eine Schwächung der Energie der Doppelbindung führt zu einer Erniedrigung der Frequenz der Wellenzahl[81)82)].

HERGERT und KURTH[83)] geben für die C=O-Gruppe eines nicht substituierten Flavanons die Wellenzahl 1680 $cm^{-1}$ an. Für das nicht substituierte Flavon (IV) findet man die C=O-Bande bei 1650 $cm^{-1}$. Eine Erklärung für die relativ geringe Rot-Verschiebung im Vergleich zum Flavon bieten die Resonanzverhältnisse im Molekül. Während im Flavanon eine entsprechende Mesomerie mit der Grenzformel II nur in geringem Maße ausgebildet wird, kommt diese beim Flavon voll zur Auswirkung (III u. V). Dadurch ergibt sich eine Schwächung der C=O-Doppelbindung. Diese Erklärung stimmt mit Ergebnissen überein, die GEISSMAN und Mitarbeiter[84)85)] bei der polarographischen Reduktion von Flavonen, Flavanonen und Chalkonen erhalten haben, ferner mit der Tatsache, daß nur von Flavanonen Hydrazone gebildet werden können (siehe auch DOUGLASS und Mitarbeiter[86)]).

---

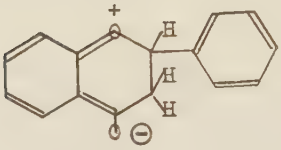
81) L.J.BELLAMY, Ultrarotspektrum und chemische Konstitution Darmstadt (1955)
82) W.BRÜGEL, Einführung in die Ultrarotspektroskopie, Darmstadt (1954)
83) H.L.HERGERT u. E.F.KURTH, J.Amer.chem.Soc. 75, 1622 (1953)
84) T.A.GEISSMAN u. S.L.FRIESS, J.Amer.chem.Soc. 71, 3893 (1949)
85) D.W.ENGELKEMEIR, T.A.GEISSMAN, W.R.CROWELL u. S.L.FRIESS, J.Amer.chem.Soc. 69, 155 (1947)
86) C.D.DOUGLASS, Q.L.MORRIS u. S.H.WENDER, J.Amer.chem.Soc. 73, 4023 (1951)

Formelbild 10



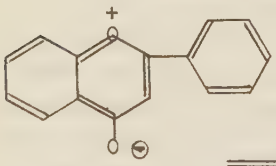
(I)

Formelbild 11



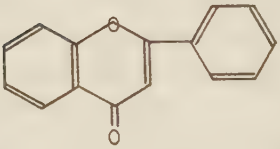
(II)

Formelbild 12



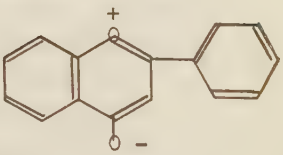
(III)

Formelbild 13



(IV)

Formelbild 14

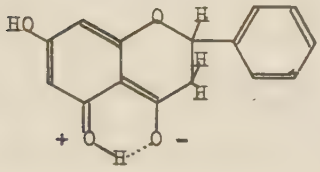


(V)

Bei der Untersuchung der Infrarotspektren verschiedener anderer Flavanone beobachteten wir eine Erniedrigung der Frequenz der Carbonylbanden durch Einführung einer Hydroxylgruppe am C-5 und gleichzeitig am C-7. So verschob sich bei den C-5 substituierten Flavanonen die Wellenzahl um 60 $cm^{-1}$ nach den kurzen Wellen, während die Flavone bei Einführung einer Hydroxylgruppe am C-5 eine Verschiebung der Wellenzahl um nur 5 $cm^{-1}$ nach den langen Wellen hin erleiden.

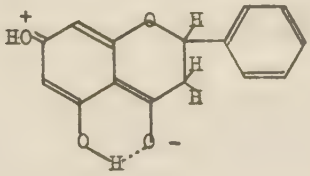
Die Ursache für die relativ starke Verschiebung beim Flavanon ist in der Ausbildung der beiden Resonanzstrukturen VI und VII zu sehen.

Formelbild 15



(VI)

Formelbild 16



(VII)

Beim C-5 und C-7-Hydroxyl substituierten Flavon ist die Stabilisierung des Chelates nicht in dem Maße möglich.

Bei Hesperidin, Naringin, Homoeriodictyol, Hesperetin und Naringenin fanden wir diese Angaben bestätigt. Die Frequenzerniedrigung war bei den Aglykonen im Mittel um 10 $cm^{-1}$ grösser als bei den Glykosiden.

Tabelle 29 gibt einen Überblick über die Lage der C=O-Bande bei den von uns untersuchten Flavanonen im Vergleich zu den analogen Flavonen bzw. Flavonglykosiden.

Tabelle 29

| Substanz | Wellenzahl $cm^{-1}$ | Substanz | Wellenzahl $cm^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| unsubstit.Flavanon | 1680**) | unsubstit.Flavon | 1650*) |
| 5-hydroxyflavanon | 1620**) | 5-hydroxyflavon | 1655*) |
| 3,5-hydroxyflavanon | 1642**) | 3,5-hydroxyflavon | 1662*) |
| Aglykone | | Aglykone | |
| 5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon (Hesperetin) | 1633 | 5,7,3',4'-tetrahydroxy-flavon (Luteolin) | 1650 |
| 5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyflavanon (Homoeriodictyol) | 1633 | 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavon (Diosmetin) | 1658 |
| Glykoside | | Glykoside | |
| Hesperetin-7-rhamno-glucosid (Hesperidin) | 1643 | Luteolin-7-glucosid | 1668 |
| Naringenin-7-rhamno-glucosid (Naringin) | 1643 | Apigenin-7-glucosid (3,7,5-trihydroxy) | 1668 |

*) nach F.GLOGGENGIESSER, Dissertation München, Juni 1957
**) nach H.L.HERGERT u. E.F.KURTH (Die Angaben beziehen sich auf Nujol als Lösungsmittel)

b) Frequenz und Intensität der OH-Banden

Eine weitere bemerkenswerte Erscheinung in den IR-Spektren der Flavanonaglykone ist die schwach ausgeprägte OH-Bande bei 3400 $cm^{-1}$ und das Auftreten einer zweiten Bande bei 3105 $cm^{-1}$, die bereits von H.L.HERGERT und KURTH[87] beobachtet wurde. Ihr Erscheinen dürfte mit einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zusammenhängen.

87) H.L.HERGERT u. E.F.KURTH, J.Amer.chem.Soc. 75, 1622 (1953)

Während sowohl Flavonglykoside als auch Flavonaglykone bei 3400 - 3100 $cm^{-1}$ eine starke Bande besitzen, findet man eine ähnlich starke Itensität nur bei den Flavanonglykosiden.

c) Der Einfluß verschiedener Substitution im Seitenphenyl

Nach Arbeiten von BELL, THOMPSON und VAGO[88] sowie COLE und THOMPSON[89] kann man allgemein die intensivste der in den IR-Spektren substituierten Benzolderivate zwischen 700 und 900 $cm^{-1}$ vorkommenden Banden einer gleichphasigen "wagging"-Schwingung der noch am Benzolring vorhandenen Wasserstoffatome zuordnen (siehe auch DANNENBERG, SCHIEDT und STEIDLE[90]). GLOGGENGIESSER[91] diskutierte diese Banden bei Flavonen und Flavanolen im Sinne der obigen Zuordnung.

Beim Naringinmolekül mit einer Monosubstitution im Seitenphenyl tritt in diesem Bereich eine etwas stärkere Bande bei 808 $cm^{-1}$ und eine schwächere Bande bei 833 $cm^{-1}$ auf.

Dagegen zeigen Homoeriodictyl und Hesperetin mit Disubstitution im Seitenphenyl im genannten Bereich drei bis vier ausgeprägte Maxima, von denen keines gegenüber dem anderen besonders betont ist. Somit gelten diese bei Flavonen gefundenen Gesetzmäßigkeiten zumindest in großen Zügen auch für Flavanone . Eine strenge Parallelität ist schon deshalb nicht zu erwarten, weil der teilweise hydrierte γ-Pyronring seinen Einfluß geltend macht.

Die Abbildungen 9 - 12 zeigen die in KBr gemessenen IR-Spektren von Homoeriodictyol, Hesperetin, Hesperidin und Naringin.

---

88) R.P.BELL, H.W.THOMPSON u. E.E.VAGO, Proc.Soc.Ser.A. 192, 498 (1948)
89) A.R.COLE u. H.W.THOMPSON, Trans Faraday Soc. 46, 103 (1950)
90) H.DANNENBERG, U.SCHIEDT u. W.STEIDLE, Z.Naturforsch. 8 b, 269 (1953)
91) F.GLOGGENGIESSER, Dissertation München, Juni 1957

Abb. 9

$\leftarrow \tilde{\nu}\ (cm^{-1})$ Homoeriodictyol

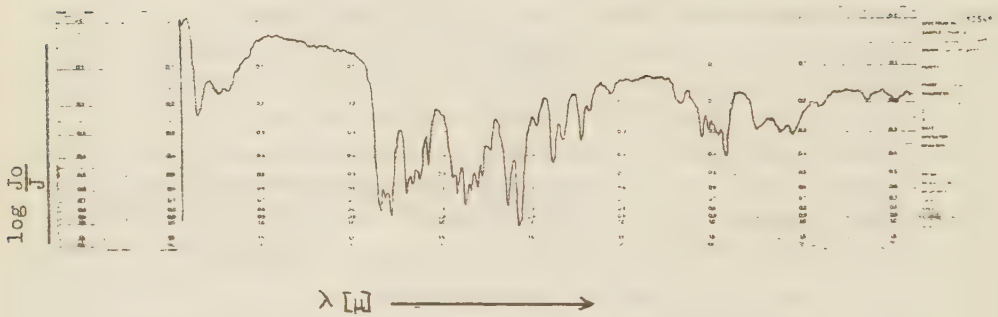



Abb. 10

$\leftarrow \tilde{\nu}\ (cm^{-1})$ Hesperetin

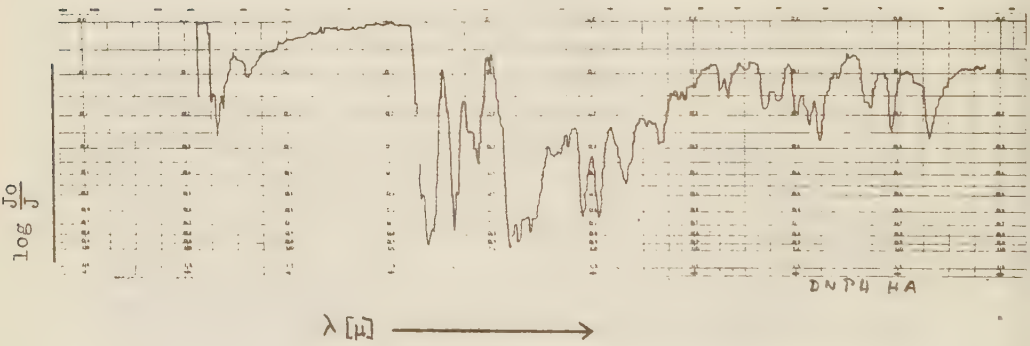



Abb. 11

$\leftarrow \tilde{\nu}\ (cm^{-1})$ Hesperidin

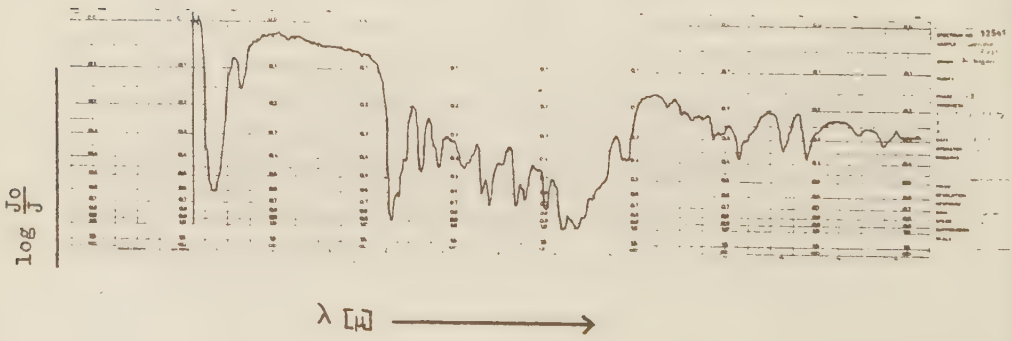
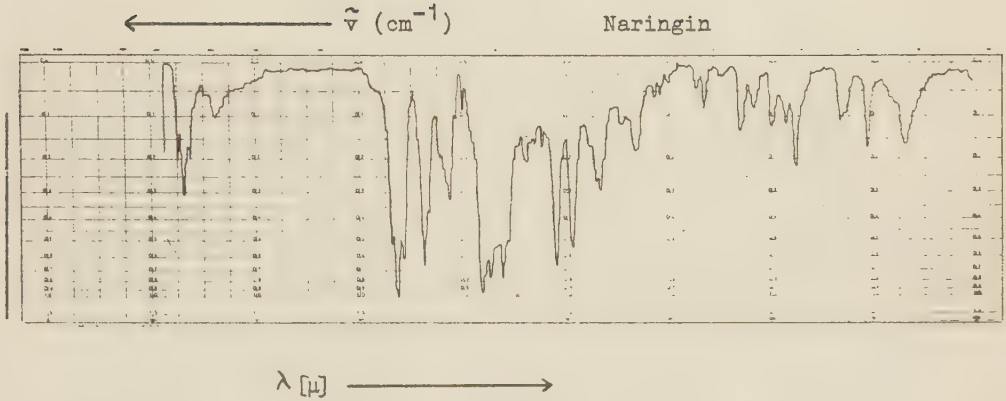


Abb. 12



# L e b e n s l a u f

Am 26. August 1930 wurde ich als Sohn des Reichsbahnamtmannes Hans Schmid und seiner Ehefrau Marie geb. Gimple in Leutkirch/Allgäu geboren.

Vom Frühjahr 1937 ab besuchte ich in Stuttgart die Volksschule und trat 1941 in die Zeppelin-Oberschule ein. 1950 erhielt ich an der Oberschule Wangen das Zeugnis der Reife.

Im Oktober 1950 begann ich als Apothekerpraktikant in der Marien-Apotheke in Ravensburg und legte im September 1952 mein pharmazeutisches Vorexamen in Tübingen ab.

Anschließend arbeitete ich als Apothekerassistent in der neu errichteten Elisabethen-Apotheke Leutkirch bis zum Beginn meines Pharmaziestudiums im Winter-Semester 1953 an der Universität Tübingen. Nach 6 Semestern bestand ich dort das pharmazeutische Staatsexamen.

Im Januar 1957 begann ich am Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter der Leitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer mit den vorliegenden Untersuchungen.

Im Oktober 1960 heiratete ich die Studentin der Pharmazie Gerlind Diebold.